

SÉRIE A, n° 1441
N° D'ORDRE :
2308

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

G. SANDOR

Assistant à l'Institut Pasteur

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION AU PROBLÈME DES PROTÉIDES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

16 NOV 1933

Soutenues le

1933 devant la Commission d'examen

Président : M. L. LAPICQUE.

Examineurs { MM. G. BERTRAND.
R. COMBES.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1933

SÉRIE A, n°
N° D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

G. SANDOR

Assistant à l'Institut Pasteur

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION AU PROBLÈME DES PROTÉIDES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1933 devant la Commission d'examen

Président : M. L. LAPICQUE.

Examineurs { MM. G. BERTRAND.
R. COMBES.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1933

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyen honoraire.... M. MOLLIARD.

Profess. honoraires.. { H. LE CHATELIER. EMILE PICARD.
H. LEBESGUE. RÉMY PERRIER.
A. FERNBACH. LÉON BRILLOUIN.
A. LEDUC. A. DEREIMS.

E. GOURSAT..... Analyse supérieure et algèbre supér.
P. JANET..... Electrotechnique générale.
F. WALLERANT..... Minéralogie.
P. PAINLEVÉ..... Mécanique anal. et mécanique céleste.
GABRIEL BERTRAND..... Chimie biologique.
M^{me} P. CURIE..... Physique générale et radioactivité.
M. CAULLERY..... Zoologie (Évolution des êtres organisés)
G. URBAIN..... Chimie générale.
EMILE BOREL..... Calcul des probabilités et phys. mathém.
L. MARCHIS..... Aviation.
JEAN PERRIN..... Chimie physique.
H. ABRAHAM..... Physique.
E. CARTAN..... Géométrie supérieure.
M. MOLLIARD..... Physiologie végétale.
L. LAPICQUE..... Physiologie générale.
E. VESSIOT..... Théorie des fonct. et théorie des transf.
A. COTTON..... Physique.
J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie.
CHARLES FABRY..... Physique.
CHARLES PÉREZ..... Zoologie.
LÉON BERTRAND..... Géolog. structurale et géolog. appliquée.
P.-A. DANGEARD..... Botanique.
Professeurs { R. LESPIEAU..... Théories chimiques.
PAUL MONTEL..... Mécanique rationnelle.
P. WINTREBERT..... Anatomie et histologie comparées.
E. RABAUD..... Biologie expérimentale.
O. DUBOSCO..... Biologie maritime.
P. PORTIER..... Physiologie comparée.
E. BLAISE..... Chimie organique.
G. JULIA..... Calcul différentiel et calcul intégral.
L. LUTAUD..... Géogr. physique et géol. dynamique..
EUGÈNE BLOCH..... Physique théorique et phys. céleste.
HENRI VILLAT..... Mécanique des fluides et applications.
CH. JACOB..... Géologie.
P. PASCAL..... Chimie minérale.
V. AUGER..... Chimie appliquée.
H. BENARD..... Mécanique expérimentale des fluides.
E. ESCLANGON..... Astronomie.
L. BLARINGHEM..... Botanique.
C. MAUGUIN..... Minéralogie.
A. DENJOY..... Mathématiques générales.
A. DUFOUR..... Physique (P. C. N.).
A. GUILLIERMOND..... Botanique (P. C. N.).
H. BÉGHIN..... Mécanique physique et expérimentale.
DE BROGLIE..... Théories physiques.
G. RIBAUD..... Etude des combustibles.

E. PÉCHARD..... Chimie (Ens. P.C.N.)
A. GUILLET..... Physique.
M. GUICHARD..... Chimie minérale.
A. MICHEL-LEVY..... Pétrographie.
G. BRUHAT..... Physique.
E. DARMOIS..... Physique.
A. DEBIERNE..... Radioactivité.
L. DUNOYER..... Optique appliquée.
M. JAVILLIER..... Chimie biologique.
L. JOLEAUD..... Paléontologie.
H. MOUTON..... Chimie physique.
F. PICARD..... Zool. (Év. êtres org.)
ROBERT-LEVY..... Zoologie.
M. FRECHET..... Calcul des probab.
et phys. math.
FOCH..... Méc. exp. des fluides.
PAUTHENIER..... Physique (P. C. N.).
M^{me} RAMART-LUCAS..... Chimie organ.
CHRETIEN..... Optique appliquée.
FREUNDLER..... Chimie (P. C. N.).
P. JOB..... Chimie générale.
LABROUSTE..... Physique du Globe.
PRENANT..... Zoologie.
VILLEY..... Méc. phys. et expér.
G. BOHN..... Zoologie (P. C. N.).
R. COMBES..... Sc. Natur. (P. C. N.).
GARNIER..... Méc. Rationnelle.
PÈRES..... Méc. des fluides.
HACKSPILL..... Chimie (P. C. N.).
LAUGIER..... Physiologie génér.
TOUSSAINT..... Technique aéronaut.
M. CURIE..... Physique (P. C. N.).

Secrétaire..... A. PACAUD
Secrétaire honoraire... D. TOMBECK



A Monsieur le Docteur E. ROUX

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur

A Monsieur le Professeur A. CALMETTE

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de Médecine
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

Hommage de reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552817_0003

A Monsieur le Docteur M.-A. MACHEBŒUF

Chef de Service à l'Institut Pasteur

En témoignage de ma profonde gratitude.

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre l'exposé des faits expérimentaux qui font l'objet de cet ouvrage, il est nécessaire de faire une mise au point peut-être un peu longue et fastidieuse de l'état actuel de nos connaissances sur l'état physico-chimique des protéides et des lipides contenus dans la matière vivante. Il règne en effet à ce sujet dans la littérature scientifique une assez grande confusion due à l'utilisation d'un grand nombre de termes plus ou moins bien définis. Un même terme peut suivant les auteurs désigner des phénomènes ou des substances très différents tandis que certains phénomènes sont dans d'autres cas dénommés de plusieurs manières différentes.

Nous allons donc chercher tout d'abord à dégager les faits connus avec certitude, puis nous étudierons ou discuterons les diverses théories édifiées sur ces bases.

PREMIÈRE PARTIE

CONTRIBUTION AU PROBLÈME
DES PROTÉIDES

INTRODUCTION

La biologie est une science assez neuve qui ne sort des cadres théologiques que depuis qu'a prévalu la théorie évolutionniste de LAMARK et DARWIN. Les forces métaphysiques qui présidaient, dans les idées d'autrefois, aux mouvements des êtres vivants et à leur volonté, disparaissent lentement si bien que les manifestations biologiques rentrent de plus en plus dans le domaine des manifestations physiques. La chimie-physique biologique a pris un développement parallèle à cette évolution qui s'oppose aux idées vitalistes.

Le vitalisme dans la chimie biologique consistait à considérer les substances d'origine biologique, les matières organiques, comme des corps ne pouvant se former que dans l'être vivant par l'intervention de forces surhumaines. Une étape très importante dans l'évolution de la biologie fut la synthèse de l'urée effectuée par WOEHLE. Cette synthèse réussie par hasard, a démontré que les matières organiques peuvent se former en dehors des êtres vivants dans des conditions physiques bien déterminées. Depuis lors l'ingéniosité humaine s'appliqua avec beaucoup de persévérance au problème physico-chimique de la constitution de la matière vivante. Les principes immédiats, fractions premières isolées des organismes vivants, se multiplient de jour en jour, la structure physico-chimique du protoplasma reste cependant encore entourée de nombreux mystères. La caractéristique essentielle de cette structure est son instabilité extrême et ceci rend la plupart des méthodes chimiques classiques trop brutales pour son analyse.

Structure du protoplasma.

Les manifestations vitales sont liées à des processus physico-chimiques évoluant en général à l'intérieur des cellules vivantes. Ces cellules sont des gouttelettes semi-solides dont la structure

microscopique fut l'objet de nombreuses controverses. Les structures en réseau, en alvéoles, etc., que l'on obtient par l'effet des fixateurs histologiques sur le protoplasma tué, étaient considérées autrefois comme des structures caractérisant la matière vivante (BUETSCHLI, HANSTEIN, HABERLANDT, etc.). Ces théories furent jugées inexactes, les structures précitées ne naissant que par l'influence des réactifs précipitants lors de la mort de la matière vivante. Dans la masse homogène du protoplasma sont cependant individualisées déjà avant la mort des petites gouttelettes (noyau, plastes et mitochondries). Chacun de ces organites paraît intervenir d'une façon spéciale dans les manifestations de la cellule en jouant un rôle bien déterminé. Ces faits définissent ce que l'on pourrait appeler la structure organisée du protoplasma.

Indépendamment de ces caractères purement statiques la matière vivante est douée d'un dynamisme spécial : elle augmente sa masse, se reproduit et manifeste des mouvements d'apparence spontanés. Cette masse organisée subit des modifications lentes dans le temps et ces modifications paraissent servir certains buts — elles répondent au grand principe de l'adaptation.

Ces caractères structuraux, ces manifestations dynamiques assument à la matière vivante une place spéciale dans le monde physique. Depuis longtemps on a voulu attribuer cette spécificité à un état physique spécial : l'état colloïdal. On a malheureusement donné au terme colloïdal une extension exagérée qui l'a rendu imprécis. On a aussi rapproché des substances protoplasmiques des suspensions anorganiques qui n'ont rien de commun avec la matière vivante. Avec le terme « colloïdal » on a maintenu arbitrairement une expression qui a engendré des erreurs et des contradictions.

L'état colloïdal est l'état de dispersion extrême d'une phase dans une autre phase, les dernières particules de la phase dispersée étant encore formées d'agrégats de plusieurs molécules. Comme le rapport entre la surface et la masse de la phase dispersée est très grand lorsque le volume des particules est très petit, on a, grâce à la conception colloïdale, cherché à interpréter certaines manifestations vitales par des phénomènes d'énergie superficielle. De la conception colloïdale deux nou-

veaux termes ont ainsi pris naissance : « adsorption » et « surface active ». Les termes « colloïdal », « adsorption » et « surface active » ne s'appliquent à la matière vivante que grâce à des analogies le plus souvent très grossières. Ces analogies permettent d'éluder les difficultés d'une étude expérimentale serrée basée sur des méthodes quantitatives. Le domaine offert par la chimie colloïdale est en effet un domaine de hasard où tout est permis et où tout est possible. La théorie colloïdale était bien souvent une explication facile qui ne faisait en réalité que voiler l'ignorance des chercheurs.

La structure physique toute particulière de la matière vivante est en rapport avec la nature toute spéciale de ses constituants. L'étude physico-chimique de ces constituants doit, indépendamment de toute comparaison hasardeuse, fournir des renseignements sur le problème de la matière vivante.

Les protéides.

Les représentants les plus typiques des constituants de la matière vivante sont les protéides. On a exagéré autrefois l'importance des protéides en les voulant considérer comme les uniques constituants de la matière vivante (théorie de LIEBIG). Actuellement nous savons que les lipides et les glucides sont des constituants de la matière vivante tout comme les protéides. Cependant la très grande complexité des molécules de protéides, leur structure physique particulière en font un groupe spécial dans les principes immédiats. Ils portent tout particulièrement la marque de leur origine vitale. Ils forment avec une facilité extrême des gels, ils subissent des évolutions chimiques profondes sous l'influence du moindre changement dans les conditions extérieures. La consistance des gels et cette instabilité rappellent d'assez près les caractères de la matière vivante.

Les protéides et les polyholosides (1) ont des poids moléculaires élevés et les principes immédiats plus simples de la matière vivante leur sont souvent unis par des forces plus ou

(1) Polyholosides remplace les anciens termes de polyoses et de polysaccharides.

moins labiles. Certains complexes formés par l'union de protéides et d'autres corps plus simples sont connus depuis longtemps. La nature de ces complexes reste souvent encore discutée, mais en tout cas ce sont des complexes souvent très stables et bien caractérisés (hétéroprotéides). D'autres liaisons plus labiles et plus variables peuvent exister entre les protéides et d'autres principes immédiats. Ces liaisons de nature extrêmement discutée, sont d'un intérêt biologique capital. Il en est ainsi particulièrement pour les rapports entre lipides et protéides et le problème des complexes lipoprotéiques sera longuement discuté au cours de notre exposé.

Nous nous occuperons presque exclusivement des protéides du sérum. L'importance de ces protéides en physiologie et en pathologie, les travaux nombreux qui les concernent et la facilité relative de leur étude physico-chimique font des protéides du sérum les représentants les mieux connus des protéides.

Le plasma est le milieu intercellulaire du seul tissu liquide : le sang. Il contient des protéides à une concentration relativement élevée (6 à 8 p. 100) et ces substances y sont dissoutes à leur état originel, tel qu'elles existaient dans la matière vivante. Les protéides naturels provenant d'autres tissus que le sang, sont emprisonnés dans les coagulums demi-solides que sont les tissus après la mort. Les divers processus expérimentaux de solubilisation que l'on peut mettre en œuvre pour les étudier, n'en isolent que des fractions plus ou moins modifiées dans leur structure physico-chimique. L'analyse physico-chimique d'une substance n'est vraiment possible que si cette substance est en solution et ce fait rend relativement plus facile l'étude physico-chimique des protéides du sérum.

Nous ne nous occuperons pas du problème chimique de la constitution des protéides. Les travaux récents (1) (2) tendent d'ailleurs de plus en plus à prouver l'exactitude de la conception originelle d'ÉMIL FISCHER. On peut dire que les protéides naturels sont constitués surtout de chaînes de polypeptides. Le problème qui se pose actuellement sous un jour nouveau et qui fera

(1) S. P. L. SØRENSEN. *Comptes Rendus des travaux du laboratoire Carlsberg*, vol. 16, n° 8 (1925).

(2) H. WALDSCHMIDT-LEITZ. *Die Naturwissenschaften*, 14, 129 (1926).

l'objet de notre exposé, se rapporte à la structure physique des protéides naturels. Les travaux récents ont modifié profondément notre conception sur la constitution des particules de protéides. Il est actuellement presque hors de doute que de nombreux polypeptides unis par des liaisons labiles concourent à la constitution de ces particules. La nature des unions et la constitution d'ensemble des particules protéidiques constituent le problème physique des protéides naturels. Ce problème touche directement celui de la constitution de la matière vivante, il présente donc une importance primordiale.

L'étude des protéides sériques est la première étape logique du vaste problème des protéides. Notre exposé qui a un peu les caractères d'une monographie, est donc justifiable d'une généralisation.

DEUXIÈME PARTIE

REVUE HISTORIQUE ET ÉNUMÉRATION
DES FAITS ANTÉRIEUREMENT ACQUIS

CHAPITRE PREMIER

PROTÉIDES DU SÉRUM

Les milieux biologiques contiennent des mélanges complexes de différents protéides. Les travaux de fractionnement n'ont jusqu'à présent pas abouti à en isoler avec certitude une espèce chimique protéidique bien caractérisée. Les difficultés sont énormes en présence de ces molécules extrêmement complexes que sont les protéides naturels.

L'étude des substances intermédiaires de la dislocation hydrolytique des protéides a fourni des acides aminés avec un rendement variable. Cette méthode ne permet de saisir que des différences grossières entre les différents protéides, car le nombre des acides aminés qui constituent une molécule protéidique est grand et de très nombreuses molécules foncièrement différentes peuvent avoir à peu près la même teneur en différents acides aminés.

Résultats obtenus par les méthodes physiques d'insolubilisation fractionnée.

*Globulines et albumines dans la conception de PANUM
et ALEX. SCHMIDT.*

Pour aboutir à une séparation et à une classification des protéides il était naturel de recourir dès le début aux caractères de solubilité. Avec un matériel dissous, comme dans le cas du sérum sanguin, rien n'était plus facile que d'appliquer des méthodes d'insolubilisation. On a donc étudié les conditions où dans le mélange complexe apparaissent des précipités. Cette

méthode a abouti au premier grand démembrement des protéides du sérum. C'est PANUM (1) qui semble avoir précisé le premier l'existence de deux grands groupes dans les protéides du sérum :

1° *Protéides précipitant par dilution simple ou par dilution accompagnée d'une légère acidification par l'acide acétique ;*

2° *Protéides restant en solution dans ces conditions.* Le caractère acide du protéide précipité a conduit PANUM à l'appeler : *la sérum-caséine.*

C'est ALEX. SCHMIDT (2) qui créa le nom de globuline (3). C'est également ALEX. SCHMIDT qui ajouta une nouvelle propriété physique aux caractéristiques de ces corps : leur précipitabilité par le chlorure de sodium à saturation.

Après ALEX. SCHMIDT, HOPPE-SEYLER et son élève TH. WEYL (4) reprennent les travaux de PANUM et remplacent l'acide acétique par l'acide carbonique pour la précipitation des globulines.

Sur ces propriétés physiques de solubilité on a pu baser une classification, mais il est évident que ces propriétés ne suffisent pas pour caractériser des espèces chimiques. Cette classification était un « faute de mieux » qui persiste encore actuellement et le démembrement basé sur ces faits ne peut pas acquérir une valeur franchement chimique. Une constante physique, telle qu'un point de fusion bien net, peut caractériser une espèce chimique, la constante de solubilité dans des conditions bien déterminées est aussi une bonne caractéristique. Ces nombres sont des unités dans une série continue de nombres et s'ils sont déterminés avec une méthode suffisamment exacte, ils caractérisent avec une probabilité à peu près égale à l'unité une certaine espèce chimique. La solubilité ou l'insolubilité par contre comme définitions qualitatives peuvent être les mêmes pour un grand nombre de substances. Pour un système biologique complexe comme le sérum, les états purement physiques peuvent aussi influencer sur la solubilité et rendre le même corps soluble ou

(1) PANUM. *Virchow. Archiv.*, 3, 1, 251 (1851).

(2) ALEX. SCHMIDT. *Reichters u. Du Bois-Raymonds Archiv.* (1862).

(3) A. SCHMIDT croyait que ces substances naissaient des éléments histologiques du sang au cours de la coagulation.

(4) TH. WEYL. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1, 72 (1877).

insoluble dans les mêmes conditions suivant son histoire antérieure.

Critique de HAMMARSTEN.

Ces faits étaient bien connus d'HAMMARSTEN (1) quand il a entrepris l'étude critique des travaux de fractionnement effectués sur les protéides du sérum. Pour cet auteur la définition physique des globulines : insolubilité dans l'eau distillée et celle des albumines : solubilité dans l'eau distillée, sont basées sur des propriétés très mal choisies. En étudiant les différentes fractions précipitées au cours de la dialyse, il observe que ces précipités peuvent être une fois solubles dans l'eau distillée et insolubles une autre fois. Ce fait, auquel on a donné ultérieurement une signification toute différente, n'est explicable pour lui que si l'on suppose que la solubilité dépend de la présence d'impuretés. Le fait bien connu de l'existence de lécithide entraîné avec les globulines plaiderait en faveur de cette conception.

Travaux de l'école d'HOFMEISTER.

Une autre méthode de fractionnement fut introduite par HOFMEISTER et vulgarisée par son école (2). Cette méthode très en vogue pour le fractionnement des milieux biologiques utilise le sulfate d'ammonium. Ce sel à anion divalent est extrêmement soluble, il a un effet précipitant très énergique sur les molécules complexes que sont les colloïdes biologiques. Le sulfate d'ammonium à saturation précipite tous les protéides du sérum.

Globulines et albumines dans l'idée d'HOFMEISTER.

HOFMEISTER fractionnait en considérant les quantités précipitées en fonction de la concentration. Il considérait les concentra-

(1) Consulter en particulier : O. HAMMARSTEN. *Ergebnisse der Physiologie*, 1, 330 (1902).

(2) FR. HOFMEISTER. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 24 à 28 (1888 à 1890).

tions critiques, où entre certaines limites de concentrations il n'apparaît plus de précipité. KAUDER (1) appliqua cette méthode pour le fractionnement des protéides du sérum. Suivant les directives d'HOFMEISTER il démontra tout d'abord que les protéides ne sont pas modifiés sensiblement par la précipitation saline. Pour la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium il trouva une zone critique très nette qui sépare en deux grands groupes les protéides du sérum. La concentration critique où la précipitation d'une première fraction est complète, est autour de la demi-saturation.

Les deux fractions ainsi obtenues ont montré des différences en ce qui concerne le pouvoir rotatoire et la température de coagulation. La première fraction, précipitant à demi-saturation, fut appelée globuline et la deuxième, ne précipitant complètement qu'à saturation, fut appelée albumine.

Les travaux de KAUDER furent complétés et confirmés par POHL (2). Plus tard PORGES et SPIRO (3) et FULD et SPIRO (4) continuant l'étude de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium cherchent à définir d'autres concentrations critiques dans le groupe des globulines.

Travaux d'HAMMARSTEN et leurs conclusions.

HAMMARSTEN a démontré que les diverses propriétés de solubilité ne sont pas en concordance. Les sels neutres à anion monovalent ne précipitent pas à saturation la même fraction que le sulfate d'ammonium à demi-saturation ; le sulfate de magnésium à saturation précipiterait par contre la même fraction que le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

HAMMARSTEN considère comme insuffisantes les définitions basées sur la solubilité et l'insolubilité dans l'eau distillée ou sur la précipitabilité par dilution et acidification. Ces propriétés changent en effet pour une même fraction avec l'évolution anté-

(1) KAUDER. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **20**, 411 (1886).

(2) POHL. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, **20**, 246 (1886).

(3) O. PORGES et K. SPIRO. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, **3**, 277 (1903).

(4) FULD et SPIRO. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **31**, 132 (1900).

rieure du système. A ce sujet HAMMARSTEN a mis en évidence le curieux fait suivant : la fraction précipitée par dialyse directe du sérum est moins abondante que celle qui précipite par la dialyse des globulines préalablement précipitées par le sulfate de magnésium à saturation. HAMMARSTEN considère donc que les seules propriétés utilisables pour la définition des protéides sériques sont :

1° *Pour les globulines* : la précipitabilité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ou par le sulfate de magnésium à saturation ;

2° *Pour les albumines* : la précipitabilité par le sulfate d'ammonium à saturation.

Les globulines de PANUM, d'ALEX. SCHMIDT et de l'école d'HOPPE-SEYLER ne constitueraient donc qu'une fraction des globulines d'HOFMEISTER. Pour HAMMARSTEN quand même il n'existerait qu'une unique globuline, celle définie par la méthode d'HOFMEISTER.

Démembrement des globulines : euglobulines et pseudoglobulines.

La discordance entre la méthode d'HOFMEISTER et la définition primordiale des albumines et des globulines conduisit certains auteurs à démembrer les globulines du sérum. Certains faits observés déjà par HAMMARSTEN furent précisés par MARCUS EMIL (1) : le sérum débarrassé par dialyse des fractions insolubles dans l'eau distillée, donne encore un précipité abondant par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

MARCUS EMIL, comme HAMMARSTEN, ne considère pas ces deux fractions comme des espèces chimiques différentes car il ne peut pas observer de différence nette entre leurs températures de coagulation ou leurs pouvoirs rotatoires. Malgré cette hésitation l'auteur emploie deux termes différents pour désigner les deux fractions de la globuline d'HOFMEISTER : 1° *euglobuline* pour la fraction insoluble dans l'eau distillée et 2° *pseudoglobuline* pour la fraction soluble dans l'eau distillée. Ces deux termes furent consacrés par l'usage.

(1) MARCUS EMIL. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 28, 559 (1899).

La méthode d'HOFMEISTER sembla apporter de nouvelles précisions à ces définitions, mais en fait elle ne fit qu'augmenter la confusion. L'étude des zones critiques de précipitation, poursuivie par SPIRO, PORGES et FULD (1) (2) donna en effet deux fractions globuliniques, mais les zones critiques furent très peu nettes et les zones de précipitation empiétèrent l'une sur l'autre. On adopta quand même le terme : *euglobuline* pour la fraction qui précipite au tiers de saturation en sulfate d'ammonium et on dénomma *pseudoglobuline* le protéide précipitant entre tiers et demi-saturation.

Ces définitions furent consacrées par l'étude immunologique lorsque W. SENG (3) démontra que les anticorps du sérum antidiphthérique restent avec la fraction pseudoglobulinique. Cet auteur se sert de la méthode de dialyse pour séparer les deux fractions globuliniques, mais d'autres auteurs ont depuis employé avec un égal succès la méthode d'HOFMEISTER et la méthode de dialyse pour fractionner les immunsérums (4).

Deux couples de fractions obtenues dans des conditions différentes ont ainsi reçu les mêmes dénominations : l'*euglobuline* désigna la fraction qui était insoluble dans l'eau distillée et celle qui précipitait par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et la *pseudoglobuline* se rapportait à la fraction soluble dans l'eau distillée et celle qui précipite en présence du sulfate d'ammonium à demi-saturation. La pseudoglobuline et l'euglobuline définies par la précipitation saline ne correspondaient cependant en aucune façon à la fraction soluble et à la fraction insoluble dans l'eau distillée. FREUND et JOACHIM (5) démontrent que la fraction précipitant au tiers de saturation en sulfate d'ammonium, de même que celle précipitant à demi-saturation

(1) PORGES et SPIRO. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, **3**, 277 (1903).

(2) FULD et SPIRO. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **31**, 132 (1900).

(3) W. SENG. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, **31**, 513 (1899).

(4) Pour obtenir les soi-disant sérums purifiés on se sert en particulier couramment du sulfate de sodium qui à 14 p. 100 précipiterait la même fraction que le sulfate d'ammonium à demi-saturation (méthode de HOWE). La dialyse et la précipitation saline n'aboutissent certainement pas au même résultat ; le fait que l'on obtient, en ce qui concerne les anticorps, le même résultat par les deux méthodes, peut faire supposer que ces derniers ne constituent qu'une petite fraction des protéides ou qu'ils ne sont fixés qu'à une petite fraction des protéides du sérum.

(5) FREUND et JOACHIM. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **36**, 407 (1902).

contiennent des parties solubles et insolubles dans l'eau distillée (1).

Travaux sur les albumines.

Pendant que s'effectuaient ces nombreuses recherches sur les globulines du sérum, la fraction albuminique était bien moins étudiée. Quand GUERBER (2) réussit la cristallisation de l'albumine du sérum de cheval par la méthode d'HOFMEISTER (3) le problème apparut simplifié, mais de nombreux travaux montrèrent bientôt que pour les albumines du sérum on est aussi en présence d'un système complexe.

En 1886 HALLIBURTON (4) veut démembler l'albumine du sérum en trois fractions présentant des températures de coagulation différentes, mais HOUGARDY (5) ne trouve pas de concentration critique qui permettrait un fractionnement des albumines par le sulfate d'ammonium. MAXIMOWITS (6) comme GUERBER distingue des fractions se comportant différemment au cours de la cristallisation. OPPENHEIMER (7) distingue deux fractions qui précipitent par le sulfate d'ammonium entre des limites différentes de concentration. Un résultat analogue est retrouvé bien plus tard par DOERR et BERGER (8). ROBERTSON (9) attribue le mauvais rendement de la cristallisation (40 p. 100 des albumines dans la méthode de GUERBER) à l'existence d'une albumine cristallisable et d'une albumine amorphe.

(1) Je ne mentionne pas la troisième fraction dont parlent ces auteurs, car elle n'est soluble que dans la soude diluée et n'est donc vraisemblablement qu'une fraction des globulines dénaturées. C'est ce même fait : la dénaturation extrêmement facile du système globuline, qui a fait trouver par de nombreux auteurs des corps fantômes, disparus aussitôt après leur apparition : nucléoprotéide, natronalbuminate, glutoline, etc.

(2) GUERBER. *Sitzungsbericht d. Wuerzburger med. Ges.* (1894).

(3) FR. HOFMEISTER. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **14**, 165 (1889) et **16**, 187 (1891).

La méthode d'HOFMEISTER consistait dans l'évaporation lente de la solution de l'albumine dans du sulfate d'ammonium à demi-saturation.

(4) HALLIBURTON *Journal of Physiology*, **7**, 319 (1886).

(5) HOUGARDY. *Chem. Zentralblatt*, **2**, 682 (1900).

(6) MAXIMOWITS. *J. d. Russ. Physik.-Chem. Ges.*, **6**, 460 (1901).

(7) OPPENHEIMER. *Verh. d. Berl. physiol. Ges.* (1902).

(8) DOERR et BERGER. *Biochem. Zeitschr.*, **131**, 13 (1922).

(9) ROBERTSON. *Journal o. Biol. Chemistry*, **13**, 325 (1913).

Les résultats obtenus par ces travaux n'ont pas beaucoup de valeur; la température de coagulation est une très mauvaise constante, le rendement d'une cristallisation dépend de nombreuses conditions et l'interprétation d'une limite de précipitation peu nette, à une certaine concentration saline, reste problématique. Le problème restait donc sans solution.

Résumé et critique
des résultats des premiers travaux de fractionnement.

Cette première série d'études sur le fractionnement des liquides biologiques est très confuse. Les initiateurs eux-mêmes ne cherchaient d'ailleurs pas à effectuer un vrai fractionnement chimique. La plupart ont admis l'état colloïdal du système et leurs fractions, comme leurs dénominations, se rapportaient pour eux autant à un état d'agrégation différent qu'à des différences chimiques. Si les limites de précipitation ou les résultats quantitatifs n'étaient pas nets, si les différences chimiques étaient insignifiantes, des différences d'état d'agrégation étaient invoquées. Les dénominations proposées furent cependant adoptées et, pour un grand nombre de chercheurs, les termes : « euglobuline », « pseudoglobuline » et « albumine » ont eu la valeur de noms d'espèces chimiques.

Dans un système en état colloïdal, si on admet que le terme colloïdal présume de la nature des forces qui maintiennent la phase dispersée en solution, les propriétés de solubilité n'ont en elles-mêmes aucune valeur. L'état colloïdal est en effet un état de faux équilibre entre phase dispersante et phase dispersée; le système est donc soumis à des évolutions et les propriétés de solubilité changent avec ces évolutions. Nous reviendrons plus loin sur ces problèmes.

Les recherches portant sur les différences vraiment chimiques pouvant exister entre des fractions de propriétés de solubilité différentes sont malheureusement très peu nombreuses. Des difficultés extrêmes surgissent d'ailleurs au cours des études de ce genre.

Quelques résultats semblent cependant acquis. Une différence de constitution profonde sépare le groupe des globulines de celui

des albumines. Cette différence doit être grossière pour être saisie par des méthodes aussi peu sensibles que la détermination de la température de coagulation ou la mesure du pouvoir rotatoire des protéides. La limite de précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation est d'ailleurs très nette et on pouvait s'attendre à ce qu'elle correspondit à une différence sensible entre les globulines et les albumines.

Les méthodes analytiques sont complètement insuffisantes pour saisir des différences peu apparentes. La température de coagulation dépend de nombreuses conditions (1) (2) dont l'observation rigoureuse est à peu près impossible. Le pouvoir rotatoire des protéides du sérum est trop faible pour que son étude puisse faire saisir des différences si elles ne sont pas proportionnellement assez fortes. L'étude des zones critiques de précipitation mérite une mention spéciale.

PORGES et SPIRO (3), FULD et SPIRO (4), MELLANBY (5), HOWE (6) et ROBERTSON (7) ont beaucoup contribué à l'étude de cette question. La méthode a permis la séparation, à partir du sérum, de quatre fractions globuliniques et de deux fractions albuminiques.

La solubilité en présence du sulfate d'ammonium est naturellement encore une propriété pouvant dépendre de l'état physique du système. Une différence d'agrégation à elle seule ne pourrait cependant pas servir à expliquer l'existence de limites de concentration nettes et constantes chez les différents individus d'une même espèce, et même chez les différentes espèces de mammifères. Si la cause des précipitabilités différentes des divers protéides était une agrégation en état de faux équilibre, c'est-à-dire un état colloïdal, il serait impossible de retrouver les mêmes limites pour des origines et des évolutions aussi différentes. Les conditions de nutrition de l'animal, la façon de pratiquer la saignée, la technique de séparation du sérum, le temps

(1) E. FREUND et B. LUSTIG. *Biochem. Zeitschr.*, **167**, 355 (1926).

(2) S. P. L. SERENSEN. *G. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **15**, n° 9 (1923).

(3) PORGES et SPIRO. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, **3**, 277 (1903).

(4) FULD et SPIRO. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **31**, 132 (1900).

(5) MELLANBY. *Jour. of Physiology*, **38**, 288 (1908).

(6) P. E. HOWE. *The Jour. of Biol. Chemistry*, **49**, 93 (1921).

(7) ROBERTSON. *The Jour. of Biol. Chemistry*, **11**, 197 (1912).

de contact entre globules et sérum, la durée de la précipitation, l'agitation, etc., toutes conditions hasardeuses devraient influencer sur l'évolution de l'agrégation en faux équilibre labile.

Les zones critiques d'HOFMEISTER font supposer nécessairement qu'il y a dans le sérum différents types de protéides. La plupart de ces zones critiques ne sont cependant pas très nettes. Si l'on peut être très affirmatif en ce qui concerne la limite de précipitation de l'ensemble des globulines que l'on retrouve toujours la même chez tous les mammifères, on ne peut pas être aussi catégorique en ce qui concerne les autres zones critiques. Les concentrations limites pour les différentes fractions du système globuline et pour celles des albumines sont un peu variables suivant les auteurs et la plupart empiètent les unes sur les autres. Les améliorations apportées par WIENER (1) qui conseille la dilution préalable du sérum ou par P. E. HOWE (2) qui conseille l'emploi du sulfate de sodium, ne donnent pas non plus des résultats tout à fait satisfaisants. A la suite de ces travaux on ne peut conclure avec certitude que sur l'existence de deux types bien différenciés de protéides du sérum : les globulines et les albumines.

Point isoélectrique des protéides.

Il existe une autre constante physique pouvant servir à caractériser les protéides naturels : c'est le point isoélectrique. Il fut défini avant que fut précisée la notion que nous en avons actuellement. HARDY (3) observa, au cours de l'électrophorèse (*) des particules d'ovalbumine dénaturée : que dans une solution neutre les particules ne sont plus transportées ni vers l'anode ni vers la cathode, dans une solution acide elles se déplacent vers la cathode et dans une solution alcaline vers l'anode.

Le renversement des charges suivant la réaction du milieu est

(1) WIENER. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 74, 29 (1911).

(2) P. E. HOWE. *The Jour. of Biol. Chemistry*, 49, 93 (1921).

(3) HARDY. *Proc. Roy. Soc.*, 66, 110 (1900) ; *Jour. of Physiol.*, 29, (1903), proc., XXVI.

(*) On appelle électrophorèse le transport des particules colloïdales par le courant électrique, transport qui se fait suivant le signe des colloïdes vers l'anode ou vers la cathode.

d'une généralité absolue pour les colloïdes dont la charge dépend principalement des ions cristalloïdes adsorbés sur la surface des particules en suspension. Le point isoélectrique des protéides naturels fut étudié plus tard avec des méthodes plus exactes par la mesure de la concentration des ions hydrogènes (HARDY, MICHAËLIS, SØRENSEN, etc.). Les faits ont montré que l'analogie grossière qui semblait exister entre les colloïdes artificiels et les solutions de protéides masquait une différence profonde. Les recherches de J. LÆB (1) ont permis d'assimiler les protéides naturels aux ampholytes cristalloïdes solubles (*). Le point isoélectrique devenait ainsi une constante physique absolument immuable pour un protéide naturel, tout comme il l'est pour un acide aminé en solution dans l'eau.

La détermination du point isoélectrique d'un protéide naturel n'est malheureusement pas suffisamment exacte pour que cette méthode puisse différencier des protéides pas très différents les uns des autres. Les molécules complexes des protéides contiennent un très grand nombre de groupements acides et basiques, l'analyse mathématique des courbes de titration est donc impossible. L'analyse mathématique est cependant le seul moyen exact pour déterminer le point isoélectrique des ampholytes. La recherche du maximum de précipitabilité, l'observation de l'électrophorèse, la recherche sommaire d'un point d'inflexion sur une courbe de titration ne permettent que la fixation d'une région de pH plus ou moins étendue qui est le point isoélectrique moyen du protéide considéré.

Cette méthode, tout en étant insuffisante pour une analyse subtile, a permis quand même de saisir encore une fois la différence grossière qui sépare la sérumglobuline de la sérumalbumine. Le point isoélectrique moyen déterminé par les différents auteurs et par les différentes méthodes précitées est pH 4,7 pour l'albumine et pH 6 environ pour la globuline.

(1) J. LÆB. *Les protéines*, édit. Alcan, Paris (1924) ; *La théorie des phénomènes colloïdaux*, édit. Alcan, Paris (1925).

(*) On appelle ampholytes, ou électrolytes amphotères, les substances qui, de par leur structure, peuvent émettre en solution aqueuse des ions H^+ et des ions OH^- .

**Résultats obtenus par l'analyse chimique
des diverses fractions des albumines et des globulines du sérum**

Toutes les méthodes que nous avons citées jusqu'ici étaient insuffisantes pour nous montrer d'une façon définitive, si les deux grands groupes des protéides du sérum étaient constitués par des substances pures ou par des mélanges d'espèces chimiques différentes. Les quelques travaux que nous allons énumérer maintenant, montrent que ce sont des systèmes complexes dont chacun est constitué par un mélange de plusieurs substances.

Analyse élémentaire.

La méthode d'analyse chimique la plus simple consiste dans l'analyse élémentaire, mais elle n'est naturellement pas applicable à l'analyse de substances aussi complexes que les protéides. Les protéides sont des substances formées d'une vingtaine d'acides aminés, une même formule brute peut donc correspondre à un nombre illimité de ces corps. Cette méthode a donné cependant une formule légèrement différente pour les albumines et les globulines. HAMMARSTEN (1) indique par exemple les compositions suivantes pour les deux protéides du sérum : *sérum de Cheval*.

	C o/o	H o/o	N o/o	O o/o	S o/o
Globuline	52,71	7,01	15,85	22,32	1,11
Albumine	53,08	7,10	15,93	21,86	1,90

Comme on le voit, les différences sont très faibles et sauf pour le soufre, elles dépassent à peine les erreurs expérimentales.

Dosage des acides aminés.

Les teneurs en chacun des acides aminés de la globuline et de l'albumine sont assez différentes. L'albumine en particulier ne contient pas de glycocole, tandis que la globuline en contient.

(1) O. HAMMARSTEN, *Lehrbuch der physiol. Chemie*, édit. Bergmann, München, 1926.

Résultats obtenus par la formoltitration.

Des résultats bien plus intéressants ont été obtenus par F. OBERMAYER et R. WILHEIM (1). Ces auteurs ont étudié la formoltitration des globulines et des albumines des sérums de différentes espèces animales.

La quantité d'azote formoltitrable trouvé ne peut pas dépendre de l'état physique du système. Tout au moins est-il peu vraisemblable qu'il puisse exister un état d'agrégation pouvant cacher des groupements aminés vis-à-vis d'un réactif tel que le formol. Cette méthode permet ainsi un dosage titrimétrique des groupements aminés libres contenus dans les protéides.

OBERMAYER et son collaborateur mesurent le rapport de l'azote total déterminé par la méthode de KJELDAHL à l'azote formoltitrable. Ce rapport, appelé index aminique, varie comme l'inverse de la proportion de groupements aminés libres dans les molécules. OBERMAYER et WILHEIM ont constaté d'abord que ce rapport subit des variations intéressantes dans la série animale en ce qui concerne l'euglobuline et la pseudoglobuline obtenues par précipitation saline. Les auteurs notent d'ailleurs avec un certain étonnement que les chiffres obtenus varient très fortement pour les individus d'une même espèce et même pour un seul individu pour des prises différentes.

OBERMAYER et WILHEIM ont ensuite étudié une série de fractions globuliniques et albuminiques obtenues entre des limites de concentration différentes en sulfate d'ammonium : 1) La fibrinoglobuline (*); 2) deux fractions euglobuliniques; 3) les deux fractions de pseudoglobulines définies par PORGES et SPIRO (2); 4) les deux fractions albuminiques d'OPPENHEIMER (3), soit en tout sept fractions. L'index aminique est différent pour chacun de

(1) F. OBERMAYER et R. WILHEIM. *Biochem. Zeitschr.*, **38**, 331 (1912) et **50**, 369 (1913).

(2) PORGES et SPIRO. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, **3**, 277 (1903).

(3) OPPENHEIMER. *Verh. d. Berl. physiol. Ges.* (1902)

(*) La fibrinoglobuline est une substance assez hypothétique que l'on suppose produite au cours de la fragmentation moléculaire du fibrinogène du plasma. Je n'ai pas mentionné jusqu'à présent cette substance parce que son existence est fort peu probable; on doit en tout cas se demander si elle est dans le groupe des globulines une fraction bien définie.

ces précipités et sa valeur diminue progressivement d'une fraction à la suivante. Les groupements aminés libres sont donc plus nombreux dans les fractions le moins facilement précipitables par le sulfate d'ammonium. On doit en tout cas se garder de supposer que les différentes fractions que les auteurs envisagent correspondent à des espèces chimiques. La seule conclusion à tirer de ces travaux est la suivante : *globulines et albumines elles-mêmes ne correspondent nullement à des espèces chimiques, elles représentent des mélanges vraisemblablement très complexes et ces mélanges sont fractionnés par le sulfate d'ammonium.*

Dosage physique et chimique des acides aminés.

D'autres auteurs ont cherché à mettre en évidence les variations d'une propriété dépendant purement de la constitution chimique en dosant certains acides aminés contenus dans les différentes fractions. Les méthodes de dosage des acides aminés ne sont malheureusement pas encore parfaites. Certains faits de cet ordre semblent cependant établis avec certitude.

GOLDSCHMIDT et KAHN (1) ont par exemple noté des différences importantes entre trois fractions albuminiques obtenues entre des limites de concentration différentes en sulfate d'ammonium.

De nouvelles recherches furent effectuées dans cette voie par GROH et FALTIN (2). Ces auteurs ont effectué parallèlement des dosages chimiques et des mesures physiques sur les bandes d'absorption dans l'ultraviolet. Cette étude spectrographique correspond à une méthode physique de dosage des groupements actifs sur l'ultraviolet, c'est-à-dire de la tyrosine et du tryptophane.

Les résultats se sont trouvés comparables à ceux fournis par la formoltitration : des fractions absolument arbitraires obtenues à des concentrations arbitraires en sulfate d'ammonium, ont montré une constitution chimique indubitablement différente. On peut rapprocher de ces faits certains résultats obtenus par SÆRENSEN et que nous relaterons plus loin.

(1) GOLDSCHMIDT et KAHN. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **183**, 19 (1929).

(2) J. GROH et E. FALTIN. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **190**, 13 (1931).

Ces quelques travaux permettent de supposer que les systèmes « globulines » et « albumines » correspondent en réalité à une complexité chimique bien plus grande que l'on ne pense en général. Indépendamment de toute conception physique sur les solutions aqueuses des protéides naturels, plusieurs constituants purs, et même vraisemblablement un grand nombre de ces constituants semblent intervenir pour la formation des mélanges complexes : « globulines » et « albumines ».

Travaux de l'école de Sørensen.

SØRENSEN et ses élèves sont à peu près les seuls qui se soient attaqués au travail gigantesque de la séparation d'espèces chimiques bien définies en partant de protéides naturels. Leurs nombreux insuccès mettent en évidence les difficultés extrêmes qui entourent ces recherches.

Une série de travaux fut commencée en 1917 dans le laboratoire de Carlsberg sur l'albumine d'œuf (1), substance relativement bien définie, facile à purifier par des recristallisations successives. A la suite de ces travaux, SØRENSEN considère l'ovalbumine comme une espèce chimique possédant lorsqu'elle est purifiée, une constante de solubilité bien caractérisée.

En ce qui concerne les protéides du sérum les recherches furent moins fructueuses. SØRENSEN (2) (3) se rangeant à l'opinion d'Hofmeister, admet l'existence de globulines solubles (pseudoglobulines) et de globulines insolubles (euglobulines) dans l'eau distillée. Il fractionne l'euglobuline par dialyse puis dissolution dans une solution saline et précipitation par dilution et acidification. La pseudoglobuline est purifiée à partir des fractions solubles par précipitation fractionnée au moyen du sulfate d'ammonium à des concentrations variables.

Au cours de ces fractionnements, SØRENSEN retrouve deux

(1) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 12 (1917).

(2) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 15, n° 11 (1923).

(3) S. P. L. SØRENSEN. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 47, 457 (1925).

faits constatés avant lui par HARDY (1) et MELLANBY (2) d'une part et par H. CHICK (3) d'autre part, à savoir :

1° *Influence sur la solubilité d'une fraction protéidique, de la quantité totale de ces protéides mise en présence du solvant.*

En mettant des quantités variables de globulines provenant de la même fraction toujours en excès en présence de la même quantité d'un même solvant (solution tampon de pH et de concentration bien définis), la solubilité augmente avec la quantité de protéides. Ce fait fut retrouvé pour toutes les fractions et l'allure des courbes ne peut pas être expliquée simplement par la présence d'impuretés solubles.

2° *Naissance continue de fractions solubles à partir des fractions insolubles.*

Si après avoir précipité les euglobulines par dialyse on les remet en solution dans un solvant salin pour les précipiter ensuite une deuxième fois, puis si l'on répète cette même série d'opérations plusieurs fois, on constate qu'une quantité plus ou moins importante de protéides reste toujours en solution. Ces fractions solubles semblent ainsi prendre naissance à partir des fractions insolubles.

Le comportement curieux observé pour le système globuline du sérum fut retrouvé pour tous les protéides naturels étudiés par l'école de SØRENSEN (4) (5) (6) (7) (albumine du sérum, caséine, gliadine), l'ovalbumine elle-même semble présenter une légère tendance à l'augmentation de la solubilité avec l'augmentation de la quantité d'ovalbumine, mise en présence du solvant (8).

L'albumine du sérum semble *a priori* se prêter plus facilement à un fractionnement physico-chimique que les globulines,

(1) W. B. HARDY. *Jour. of Physiol.*, **33**, 251 (1905).

(2) MELLANBY. *Jour. of Physiol.*, **33**, 338 (1905).

(3) H. CHICK. *The Biochem. Jour.*, **8**, 261 et 404 (1914).

(4) KINSUKE-KONDO. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **15**, n° 8 (1923-1925).

(5) K. LINDERSTROM-LANG. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **176**, 76 (1928); *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **17**, n° 9 (1929).

(6) S. P. L. SØRENSEN et I. SLADEK. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **17**, n° 14 (1929).

(7) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **18**, n° 5 (1930).

(8) S. P. L. SØRENSEN, M. SØRENSEN et M. A. MACHEBŒUF. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. **16**, n° 12 (1927)

car on peut l'obtenir à l'état cristallin. Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, ce système est apparu aussi complexe que les globulines. Conformément aux travaux de GOLDSCHMIDT et KAHN (1) trois séries de substances furent obtenues à partir de l'albumine du sérum de Cheval; leurs précipitabilités étaient différentes et des essais sommaires de détermination des produits d'hydrolyse ont montré des différences assez nettes dans leurs teneurs en acides aminés. Les solubilités, d'ailleurs foncièrement différentes pour les trois séries de fractions, dépendaient fortement pour chacune d'elles de la quantité totale de protéides mises en présence du solvant.

Travaux de THE SVEDBERG.

Mentionnons enfin dans cette revue historique succincte les travaux de SVEDBERG et de ses collaborateurs (2). Ces auteurs étudient par la méthode d'ultracentrifugation le poids moléculaire des protéides naturels en général et des protéides du sérum en particulier. Ces auteurs trouvent une série de protéides naturels ayant tous pour poids moléculaires un multiple simple de 35.000. A cette série appartiennent : l'ovalbumine, la sérum-albumine, la sérumglobuline. La caséine apparaît comme un mélange de plusieurs substances de poids moléculaires divers. L'ovalbumine a un poids moléculaire de 34.500, la sérum-albumine 70.000 et la globuline du sérum 105.000.

Le système : « protéide naturel » apparaît comme étant d'une labilité extrême et la dilution suffit pour faire apparaître dans les sérums des fractions qui ne se déposent pas par centrifugation qui ont donc un poids moléculaire bien inférieur à 35.000. Ces changements sont le plus souvent réversibles et si l'on concentre par dialyse sous pression les solutions contenant les fractions à faible poids moléculaire, on retrouve le poids moléculaire initial. La réversibilité ne semble cependant pas être

(1) GOLDSCHMIDT et KAHN. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **183**, 19 (1929).

(2) Voir les travaux de THE SVEDBERG en plusieurs publications. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **48** (1926) à **52** (1930); THE SVEDBERG. *Kolloidzeitschr.*, **36** b. (*Zsigmondy Festschrift*) 53 (1925); *Zeitschr. f. physik. Chem.*, **121**, 65 (1926); **127**, 51 (1927).

absolument constante; dans un travail récent (1) SVEDBERG et SJERGEN démontrent en effet que le système globuline subit un changement irréversible par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium. Primitivement le système globuline apparaît comme ayant un poids moléculaire unique, mais après précipitation saline et dissolution on est en présence d'un mélange de substances de poids moléculaires différents. Si l'on se remet dans les conditions originelles en dialysant et mélangeant les constituants, on ne retrouve plus le poids moléculaire unique, bien défini, observé au début. Ce résultat est d'une importance capitale pour la compréhension de certains phénomènes; la seule objection à faire est que les auteurs ne précisent pas suffisamment si les conditions thermodynamiques étaient bien observées dans le cycle de réversibilité, il faudrait en particulier savoir si les conditions de concentration étaient bien constantes.

Résumé des résultats essentiels des travaux cités ci-dessus.

Si l'on veut résumer le contenu des pages précédentes, de nombreux points restent encore dans le vague en ce qui concerne les protéides naturels. Deux faits apparaissent cependant tout à faits évidents :

1° De nombreuses espèces chimiques constituent les systèmes auxquels nous donnons des dénominations uniques, « albumine », « globuline », ces termes ont donc des définitions plus ou moins arbitraires.

2° Ces constituants semblent être réunis dans des systèmes extrêmement labiles qui évoluent avec une facilité extrême quand les variables thermodynamiques et tout particulièrement les concentrations subissent des changements. Les travaux d'OBERMAYER et WILLHEIM, de GOLDSCHMIDT et KAHN, de GROH et FALTIN, de SØERENSEN et de ses collaborateurs prouvent que des différences chimiques profondes existent entre de nombreuses fractions obtenues à partir de la globuline du sérum, de la sérumalbumine et de la caséine. Ceci rend probable l'existence d'un grand

(1) THE SVEDBERG et B. SJERGEN. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 2855 (1930).

nombre de constituants qui sont des espèces chimiques différentes. Des poids moléculaires uniques semblent caractériser quand même à l'origine ces systèmes complexes — ceci résulte avec évidence des travaux de SVEDBERG et de ses collaborateurs. Des différences de poids moléculaires faibles peuvent il est vrai ne pas être révélées par les méthodes utilisées et des espèces chimiques différentes peuvent avoir des poids moléculaires identiques ou très voisins. Ceci résulte également de l'existence de zones critiques de concentration très nettes séparant par précipitation de grandes fractions complexes.

Conception de SÆRENSEN.

SÆRENSEN admet (1) l'existence de systèmes de composants, ces composants seraient des chaînes polypeptidiques formées d'acides aminés réunis par des forces de valence primaire — ce sont les chaînes de valence principale. Ces espèces chimiques élémentaires serait réunies en des sortes de polymères par des forces de valence secondaire et les différents polymères seraient enfin réunis entre eux par les mêmes forces. Ces complexes pourraient d'ailleurs contenir d'autres constituants que des polypeptides, tels que des groupements phosphorés ou éventuellement des lipides.

SÆRENSEN donne à ces systèmes de composants la formule : $A^x B^y C^z \dots$ etc. et suppose qu'ils évolueraient avec une facilité extrême d'une façon réversible en mettant en liberté certaines chaînes ou en échangeant entre eux différents constituants.

Les conclusions de SÆRENSEN sont basées principalement sur le comportement du système globuline et sur les propriétés particulières de solubilité semblant caractériser tous les protéides naturels.

Il est très difficile d'énoncer une conclusion définitive concernant la constitution des protéides naturels ; il existe encore de nombreuses inconnues. Les caractères physico-chimiques invoqués par SÆRENSEN sont assez discutables. Les propriétés parti-

(1) S. P. L. SÆRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 18, n° 5 (1930).

culières de solubilité des protéides naturels sont retrouvées par WO. OSTWALD et ses élèves (1) (2) dans le cas de différents colloïdes de la chimie minérale, les questions d'aggrégation colloïdale et réactions en système hétérogène pourraient ainsi jouer un rôle. Il y a surtout un point capital, où le dernier mot n'est certainement pas encore dit, c'est la question de la réversibilité du système. La conclusion de SÆRENSEN que les protéides naturels sont des systèmes réversibles, ne nous semble pas être étayée par tous les faits.

Il est non moins vrai qu'il faut faire jouer un rôle primordial aux valences résiduelles dans l'explication des propriétés physico-chimiques du système. Ceci ressort avec une évidence nouvelle de l'étude des rapports qui unissent les lipides et les protéides naturels. Avant de terminer la discussion du problème, nous allons entreprendre l'étude historique de cette question.

(1) WO. OSTWALD. *Kolloidzeitschr.*, **41**, 163 (1927).

(2) A. V. BUZAGH. *Kolloidzeitschr.*, **41**, 169 (1927).

CHAPITRE II

CARACTÈRES PARTICULIERS DES GRAISSES CONTENUES DANS LA MATIÈRE VIVANTE

On sait depuis fort longtemps que les lipides contenus dans la matière vivante sont dans un état particulier, des travaux chimiques et des travaux histologiques ont précisé cette notion. Le débat est cependant encore ouvert en ce qui concerne l'interprétation des faits expérimentaux.

Travaux histologiques.

C'est la science histologique qui est la plus riche en preuves concernant le comportement particulier des lipides des tissus vivants. Les réactions histochimiques fournissent un ensemble de faits intéressants (1) (2). La plupart des lipides des tissus vivants ou morts ne prennent pas directement les colorants — les lipides tissulaires se trouvent donc sous une forme cachée à leurs réactifs histochimiques habituels.

Caractères histochimiques des tissus vivants.

Les tissus vivants ne réagissent pas comme les tissus morts vis-à-vis de divers réactifs colorants. La technique désignée par le terme « coloration vitale » consiste à colorer les tissus vivants sans les tuer au moyen de certains réactifs spéciaux (violet de

(1) (2) On peut trouver un bon exposé de ces faits dans les deux ouvrages suivants : A. PARAT. *Archives d'anatomie microscopique*, 24, 73 (1928) ; A. KIESEL. *Die Chemie des Protoplasmas*. Edit. : Borntraeger, Berlin, 1930.

méthyle, violet Dahlia, vert Janus, etc.). Cette méthode permet d'obtenir une coloration pâle, diffuse du tissu vivant. Cette coloration pâle et diffuse est remplacée au moment de la mort par une coloration intense de granules lipoidiques.

Pour expliquer ce comportement différent d'un matériel mort et d'un matériel vivant LEPESCHKIN (1) invoque une théorie chimique. Au moment de la mort des complexes lipoprotéiques d'une constitution extrêmement labile seraient fragmentés d'une façon irréversible avec mise en liberté des lipides. Ces complexes lipoprotéiques seraient les constituants essentiels de la matière vivante.

BEAUVÉRIE (2) observe l'apparition de gouttelettes de graisses dans divers états physiologiques et pathologiques de la vie cellulaire. Les graisses tissulaires semblent naître brusquement de quelques autres constituants cellulaires et ces démasquages subits seraient pour lui explicables par une théorie physique. Il s'agirait en particulier dans la dégénérescence graisseuse d'un déséquilibre des colloïdes lipoprotéiques. Le terme « colloïdes lipoprotéiques » manque de précision.

Au. LUMIÈRE (3) admet une théorie un peu analogue. L'impossibilité de colorer la matière vivante résulte pour lui de l'immunité du granule micellaire. La charge électrique entourant les micelles colloïdales de la matière vivante en fait un système indépendant dont les aptitudes chimiques, inhérentes aux constituants moléculaires sont cachées. Pour que les groupements chimiquement actifs puissent se révéler, il faudrait que le granule meure en évoluant vers une maturité : « la floculation ». Somme toute à la base de la colorabilité il y aurait un déséquilibre des colloïdes protoplasmiques, comme dans l'idée de BEAUVÉRIE. Dans l'exposé de LUMIÈRE comme dans celui de BEAUVÉRIE, les termes sont mal définis et leurs significations sont imprécises.

L'apparition des gouttelettes de graisses qui révèle en quelque sorte, au colorant, les lipoides (*) a reçu le terme assez mal-

(1) W. W. LEPESCHKIN. *Arch. f. exper. Zellforschung*, 4, 212 (1927); *Biochem. Ztschr.*, 171, 126 (1926).

(2) BEAUVÉRIE. *C. R. Soc. Biol.*, 98, 1. 311 (1928).

(3) Au. LUMIÈRE. *Revue générale des colloïdes*, 3, 8 (1925).

(*) Il est plus exact d'utiliser pour l'ensemble des substances tissulaires solubles dans les solvants organiques le terme : « substances lipoi-

heureux de « lipophanérose ». La lipophanérose caractérise ainsi l'état de maladie ou de mort des tissus vivants.

*Caractères histochimiques des lipides des tissus
après la mort.*

En ce qui concerne un matériel déjà mort les faits sont encore plus précis. La plus grande partie des graisses du matériel cellulaire reste encore cachée, incolorable, même après la mort. De nombreuses méthodes de mordantage peuvent opérer une mise en liberté plus ou moins parfaite des graisses (formol, solutions salines concentrées, etc.). Les agents les plus caractéristiques de cette lipophanérose sont les diastases protéolytiques (1) (2) (3). La pepsine et la trypsine sont en effet les révélatrices par excellence des graisses pour les colorations histochimiques. C'est cette notion qui a donné naissance à la méthode de coloration histochimique de CIACCIO. Cette méthode emploie la trypsine pour démasquer par une lipophanérose artificielle les « lipoides » des tissus.

En se basant sur ces faits, I. BANG (4), dans une étude critique d'ensemble des faits histochimiques, admet l'existence de lécithalbumines dans le matériel cellulaire.

Etude de la lipophanérose.

L'étude comparative de la lipophanérose par les différents agents dans la série animale et végétale, montre des différences intéressantes.

L'hydrolyse peptique ou tryptique révèle les lipides des tissus musculaires avec une facilité extrême ; la plupart des tissus

diques », au lieu du terme : « lipides ». Cet ensemble contient en effet des substances qui ne sont pas des lipides à proprement parler (stérols, osides, etc.), mais qui forment quand même avec les lipides vrais un ensemble physiologique bien défini.

(1) DANILEVSKY. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 7, 124 (1872).

(2) A. NOLL. *Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.* (1913), p. 35.

(3) CIACCIO. *Boll. della Soc. di Biol. Sperim.*, 1 (1926).

(4) I. BANG. *Ergebnisse der Physiol.*, 6, 131 (1907) ; 8, 463 (1909).

végétaux au contraire ne laissent pas par ce moyen leurs graisses devenir directement sensibles aux colorants. Pour provoquer la lipophanérose des cellules des plantes supérieures par une diastase protéolytique il est en général nécessaire de traiter au préalable les tissus par de l'alcool chaud. L'alcool chaud lui-même n'opère pas la lipophanérose, mais il opère un changement dans le matériel cellulaire et la lipophanérose se produit ensuite sans difficultés par les diastases protéolytiques. Certaines plantes cependant, surtout parmi les plantes inférieures (levures), présentent la lipophanérose sous l'effet protéasique direct.

En considérant ces faits H. WALTER invoque une théorie physique (1). Il suppose l'existence de micelles avec une couche superficielle polarisée. Cette couche superficielle serait constituée par des protéides dans le cas des levures, par des lipides dans le cas de la plupart des plantes supérieures. La tension superficielle entre les micelles et le milieu déterminerait cette polarisation. L'alcool par son effet bien connu sur la tension superficielle, déterminerait la dépolarisation des micelles dans le cas où la polarisation se ferait avec une couche lipidique superficielle. La couche lipidique superficielle empêcherait l'action des diastases protéolytiques, mais cette action serait rendue possible par l'alcool.

Il me semble difficile d'admettre que des lipides puissent présenter plus d'affinité pour l'eau que des protéides, ce qui serait la condition indispensable pour amener une polarisation des lipides vers la phase aqueuse dans un système lipoprotéique.

Faits chimiques concernant l'état physico-chimique spécial des graisses des tissus.

Le comportement du matériel biologique vis-à-vis des réactifs chimiques fournit de nouvelles données sur l'état physico-chimique spécial des lipides. Un fait très frappant a depuis longtemps préoccupé les biologistes : les lipides des tissus ne se laissent pas extraire à froid par les solvants habituels des graisses, tels que l'éther, la benzine, le chloroforme. Les lipides sont en

(1) H. WALTER. *Biochem. Zeitschr.*, 122, 86 (1921).

quelque sorte masqués à leurs solvants comme ils sont masqués à certains de leurs réactifs microchimiques.

Le premier auteur qui a démontré l'inextractibilité de la plupart des lipides tissulaires par un traitement direct à l'éther, semble être HOPPE-SEYLER (1). Un traitement préalable à l'alcool chaud est indispensable pour que l'extraction étherée soit efficace.

Pour extraire complètement les graisses des cellules il faut faire agir successivement l'alcool bouillant, la benzine bouillante et l'éther bouillant. Ces faits prouvent combien particulier est l'état des lipides des tissus. Des théories chimiques et des théories physiques se concurrencient pour l'explication de ces faits. C'est ce problème que nous allons aborder maintenant.

Théorie chimique.

Hypothèse de l'existence de lécithalbumines.

Travaux sur les graisses des muscles.

Des recherches intéressantes ont été effectuées sur le tissu musculaire. En 1896 DORMAYER (2) fait un épuisement étheré du tissu musculaire préalablement desséché. Le matériel ainsi traité est soumis à la digestion peptique, puis à une deuxième extraction étherée. La deuxième extraction par l'éther dissout encore 40 o/o environ des lipides.

Plus tard ERLANDSEN (3) après avoir extrait par de l'éther du myocarde desséché, le soumet ensuite à une extraction alcoolo-étherée, puis il analyse séparément les deux extraits. De l'extrait étheré direct il isole une substance spéciale, un mono-amino-diphosphatide plus ou moins bien défini : la cuorine. L'extrait alcoolo-étheré lui-même ne contient pas trace de cette substance, mais des quantités considérables de lécithides. Ces lécithides inextractibles par l'éther seraient pour lui fixés en combinaison chimique avec les protéides musculaires.

(1) HOPPE-SEYLER. *Med. Chem. Untersuchungen*, Berlin (1866).

(2) DORMAYER. *Pflügers Archiv*, 65, 90 (1896).

(3) ERLANDSEN. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 51, 71 (1907).

Conception d'HOPPE-SEYLER et de LIEBERMANN.

Cette hypothèse de l'existence de lécithalbumines dans la matière vivante avait déjà été émise par HOPPE-SEYLER (1). Des faits plaidaient en faveur de cette hypothèse : l'inextractibilité des lipides par l'éther et l'entraînement des lipides par les protéides au cours des dissolutions et précipitations successives (*). HOPPE-SEYLER et plus tard LIEBERMANN (2) retrouvent ces faits presque partout dans le règne animal, comme dans le règne végétal. Les lécithalbumines seraient pour ces auteurs des constituants essentiels de la matière vivante.

Critique de BANG.

I. BANG (3) trouve les faits purement chimiques insuffisants pour faire admettre l'existence de liaisons chimiques entre les lipides et les protéides. Il ne se sent pas autorisé à nier d'une façon formelle leur existence, mais ces recherches personnelles le guident vers une théorie physique.

Il étudie particulièrement les globules rouges. L'extractibilité par l'éther apparaît comme dépendant de l'état physique et de la présence ou de l'absence d'hémoglobine. Les hématies humides sont extractibles par l'éther, il en est de même de leurs stromas à l'état humide. Les stromas séchés sont aussi extractibles, mais les hématies sèches sont inextractibles. L'hémoglobine en précipitant dans les hématies au cours de la dessiccation, emprisonnerait les lipides dans un précipité colloïdal.

(1) HOPPE-SEYLER. *Med. Chem. Untersuchungen*, Berlin (1886).

(*) Remarquons tout de suite que ces faits concernent tout autant les autres corps appartenant au groupe des lipides que les lécithides. Il n'y avait pas plus de raison pour admettre des lécithalbumines que des cholestérol-albumines ou même des glycérido-albumines. Cette discussion porta presque uniquement sur les lécithalbumines parce que l'idée de complexes lipoprotéiques évoluait surtout grâce au problème du phosphore protéidique.

(2) LIEBERMANN. *Archiv. f. die ges. Physiol.*, 50, 25 et 55 (1891) et 54, 573 (1893).

(3) I. BANG. *Ergebnisse d. Physiol.*, 6, 131 (1907) et 8, 463 (1909).

En généralisant ces faits il explique l'inextractibilité par l'éther des graisses des tissus par une théorie physique ; l'emprionnement mécanique des graisses par les précipités de protéides. Cette conclusion semble être assez logique si on raisonne d'après les expériences de BANG, on doit se demander cependant si on peut appliquer à la matière vivante en général les résultats obtenus avec un matériel aussi spécial que les globules rouges.

Théories physiques.

La théorie de LANGMUIR-HARKINS et son application à l'explication de l'état physique des graisses des tissus.

L'explication physique de l'état spécial des lipides tissulaires trouve une base solide dans les conclusions des exposés de LANGMUIR (1) et de HARKINS (2). HARKINS étudie sur un très grand nombre de substances le comportement des molécules au niveau des surfaces de séparation. LANGMUIR s'occupe à peu près du même sujet, ses conclusions sont cependant plus générales, nous reviendrons plus tard sur ce sujet. D'après la théorie de LANGMUIR-HARKINS les molécules dyssymétriques seraient polarisées à la surface de séparation liquide-gaz, liquide-liquide ou liquide-solide. Après avoir évolué d'une façon empirique au cours de l'étude des émulsions, ces idées s'appuient aujourd'hui sur nos connaissances théoriques de la valence chimique.

Etudes effectuées sur les émulsions de graisses dans l'eau.

Théorie de QUINCKE.

Les travaux de HARKINS sont une suite logique des travaux effectués sur le comportement des émulsions de graisses dans l'eau. Il y a une série de substances qui stabilisent les émulsions,

(1) LANGMUIR. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 1848 (1917).

(2) W. D. HARKINS, F. E. BROWN et E. C. H. DAVIES. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 354 (1917); W. D. HARKINS, E. C. H. DAVIES et G. L. CLARK. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 541 (1917).

le type de ces substances est constitué par les savons alcalins d'acide oléique. Avant les travaux de HARKINS on supposait que l'effet émulsionnant était dû tout simplement à un abaissement de la tension superficielle eau-graisse par les substances adsorbées à cette surface de séparation (théorie de QUINCKE). L'adsorption à la surface de séparation et l'abaissement de la tension superficielle sont d'ailleurs deux phénomènes connexes, comme il résulte clairement du théorème de GIBBS (*).

Théorie de DONNAN.

DONNAN et ses élèves (1) (2) font dépendre l'effet émulsionnant de trois causes ; 1° abaissement de la tension superficielle ; 2° adsorption à la surface en couche visqueuse ; 3° augmentation de la charge négative. Ces auteurs observent cependant un fait qu'il est difficile de faire s'accorder avec la théorie de QUINCKE dans sa nouvelle forme :

Si l'on étudie l'effet émulsionnant et l'activité superficielle pour les divers termes de la série des acides gras normaux monobasiques, on constate une brusque discontinuité lorsque l'on passe de l'acide caprylique à son homologue supérieur.

MAYER, SCHLÆFFER et TERROINE (3) ont observé que les savons des acides gras à poids moléculaire élevé sont colloïdaux. DONNAN invoque ce fait pour expliquer la discontinuité observée dans la série des acides gras et ajoute une quatrième condition qui serait nécessaire pour qu'une substance soit un bon stabilisant des émulsions de graisse dans de l'eau :

(*) Le théorème de GIBBS est une formule thermodynamique :

$$C = \frac{N}{RT} \frac{dF_s}{dN}$$

N = concentration moléculaire de la solution

C = concentration moléculaire de la surface

F_s = tension superficielle

qui démontre, en s'appuyant sur le deuxième principe de la thermodynamique que les substances qui abaissent la tension superficielle, sont adsorbées à la surface.

(1) DONNAN. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **31**, 42 (1899).

(2) DONNAN et POTTS. *Kolloidzeitschr.*, **7**, 208 (1910).

(3) MAYER, SCHLÆFFER et TERROINE. *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 356 (1908).

La substance devrait se trouver encore dans un état de dispersion colloïdale.

Conception de HARDY.

HARDY (1) est le premier qui se prononce dans un autre sens. A côté de l'effet global, l'effet diminuant la tension superficielle, il lui apparaît un effet spécifique, lié à la constitution des molécules qui stabilisent les émulsions. C'est la dyssymétrie du champ énergétique de certaines molécules complexes qui en déterminerait l'orientation aux surfaces de séparation, donc l'activité superficielle.

Travaux de HARKINS.

HARKINS reprend les idées purement théoriques de HARDY et démontre expérimentalement :

1° L'insuffisance du théorème de GIBBS pour les substances qui s'adsorbent aux surfaces de séparation à une concentration très élevée.

2° L'existence pour ces substances de couches monomoléculaires orientées.

La constitution de ces substances indique une dyssymétrie moléculaire, ce sont en général des molécules linéaires, dont les deux bouts ont des groupements porteurs d'affinités différentes.

Ainsi un savon sodique d'acide oléique a un bout porteur d'un groupement carboxylique ionisé éminemment soluble dans l'eau, et une autre extrémité formée d'une fonction carbure d'hydrogène éminemment soluble dans les solvants organiques et complètement insoluble dans l'eau. L'eau tend à se débarrasser des groupements carbures d'hydrogène qui sont attirés d'autre part par les molécules de glycérides — de ces deux influences résulte l'orientation moléculaire. Il est naturel que cette orientation moléculaire ne devient manifeste que pour les molécules linéaires à chaîne suffisamment longue et ceci explique l'activité

(1) W. B. HARDY. *Proc. Roy. Soc. London (A)*, **86**, 634 (1911-1912).

particulièrement élevée de ces corps dans les phénomènes superficiels.

Application de la théorie de LANGMUIR-HARKINS aux graisses contenues dans la matière vivante.

La théorie de H. WALTHER expliquait, nous l'avons vu (voir page 46), le comportement histochimique des graisses des tissus par une polarisation des micelles lipoprotéiques. En faveur de cette théorie des preuves très intéressantes ont été réunies par R. DEGWITZ (1) qui applique la théorie de LANGMUIR-HARKINS à la matière vivante.

Pour ce faire, on doit avant tout admettre deux phases dans la matière vivante : une phase de graisses neutres et une phase d'eau. Les graisses neutres seraient émulsionnées dans un état de dispersion extrême et cette émulsion serait stabilisée par les colloïdes hydrophiles du sérum (protéides, lécithides) et par les électrolytes adsorbés.

Les faits apportés par l'auteur en faveur de sa théorie tendent à démontrer une concordance entre les phénomènes de renversement des phases, connus en physico-chimie et l'antagonisme biologique qui existe entre diverses substances organiques et minérales.

Etudes physico-chimiques sur le renversement des phases d'émulsion.

Le renversement des phases est la transformation d'une émulsion de graisses dans l'eau en une émulsion de l'eau dans de la graisse (ou le processus inverse).

W. OSTWALD supposait (2) en se basant sur un calcul mathématique que le renversement des phases dépend de la proportion réciproque des constituants de la phase dispersée et de la phase dispersante. C'est ainsi qu'une émulsion de graisse dans de

(1) R. DEGWITZ. *Ergebnisse der Physiol.*, 32, 821 (1931).

(2) W. OSTWALD. *Kolloidzeitschr.*, 6, 103 (1910).

l'eau se transformerait indépendamment des autres conditions, en une émulsion d'eau dans la graisse lorsque le volume de la phase dispersée (graisse) occuperait 74,04 o/o du volume total.

Pour effectuer ses calculs OSTWALD admet que les globules d'émulsion sont rigoureusement sphériques. BANCROFT (1) démontre que la déduction d'OSTWALD est fautive; les globules d'émulsion ne sont en effet pas nécessairement sphériques, leur configuration comme la nature de la phase dispersante et celle de la phase dispersée dépendent avant tout de l'agent émulsifiant. C'est ainsi que les savons à cation plurivalent produisent l'inversion et remplacent la phase dispersante eau par une phase dispersante graisse. Les savons à cation monovalent font l'inverse.

CLOWES (2) vérifie les propositions de BANCROFT dans de nombreuses expériences. SEIFRITZ (3), HARKINS et HUMPHERY (4), SPRANGER, FERNBACHER et DEGKWITZ (5) démontrent qu'il y a dans les phénomènes de renversement des phases le même antagonisme entre les colloïdes organiques hydrophiles (lécithides, protéïdes) et hydrophobes (stéroïdes et stérïdes) qu'entre les savons à cation monovalent et ceux à cation divalent. L'activité de ces substances dans la détermination du renversement des phases dépasse d'ailleurs celle des savons.

Ces faits sont en bon accord avec l'hypothèse de BANCROFT, d'après laquelle la couche d'adsorption pourrait être considérée comme une troisième phase qui tendrait à tourner sa face convexe vers la phase où l'énergie libre est le plus diminuée. Cette hypothèse est basée sur le deuxième principe de la thermodynamique, d'où résulte que la surface, dont l'énergie libre est maximale, doit tendre à diminuer. Les colloïdes hydrophiles devraient ainsi déterminer une face convexe graisse, donc une émulsion de graisse dans de l'eau, les colloïdes hydrophobes une face concave graisse, donc une émulsion d'eau dans de la graisse.

(1) BANCROFT, *Journ. of Physiol. Chem.*, **17**, 501 (1913); **19**, 275, 35, 513 (1915).

(2) CLOWES, *Kolloidzeitschr.*, **15**, 123 (1914).

(3) SEIFRITZ, *Amer. Jour. Physiol.*, **66**, 124 (1923).

(4) HARKINS et HUMPHERY, *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 242 (1916).

(5) R. DEGKWITZ, *Ergebnisse d. Physiol.*, **32**, 821 (1931).

Pour les savons cette explication est insuffisante parce que l'ion calcium est aussi hydrophile que l'ion sodium. Pour ce cas spécial l'explication de HILDEBRANT, DREYER et FINKEL (1) semble être plus logique. Cette explication part de la supposition d'une couche monomoléculaire orientée. Dans le cas d'un savon à cation divalent deux anions carboxyliques sont réunis par un seul cation, le pôle hydrophile tourné vers l'eau est donc un sommet aigu qui tend à donner une forme concave à la face vers laquelle il s'oriente et à transformer l'émulsion de graisse dans l'eau en une émulsion d'eau dans la graisse. Conformément à cette théorie la stabilité des émulsions en présence de savons à cation monovalent augmente avec le diamètre des cations.

Faits du domaine biologique présentant un certain parallélisme avec les phénomènes de renversement des phases.

Antagonisme des cations.

Le parallélisme entre les faits précédents et un grand nombre de manifestations biologiques est un fait frappant. Un premier ensemble de faits est constitué par l'antagonisme entre les cations qui interviennent dans la constitution du milieu intercellulaire.

J. LOEB (2) étudiant la parthénogénèse des œufs d'Oursin observe un antagonisme entre l'ion sodium et les cations divalents : calcium et magnésium. L'ion sodium augmenterait la perméabilité des œufs, les ions calcium et magnésium la diminueraient. Sur les poissons d'eau douce l'effet toxique de l'ion sodium est neutralisé par l'ion calcium.

L'antagonisme des ions sodium et calcium sur le fonctionnement du cœur est bien connu et a donné naissance aux solutions équilibrées type RINGER. Le même antagonisme se retrouve encore dans le fonctionnement du système nerveux (rapport entre la tétanie et la diminution des ions calcium dans le sérum

(1) Ph. FINKEL, H. D. DREYER et J. H. HILDEBRANDT. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **45**, 2780 (1923).

(2) J. LOEB. *The dynamics of living matter*, édit. Macmillan, New-York, 1906.

sanguin, importance capitale accordée aux ions sodium et calcium dans l'équilibre du système neuro-végétatif). L'ion sodium augmenterait l'excitabilité nerveuse, l'ion calcium la diminuerait.

Antagonisme lipoïdique.

On trouve un deuxième ensemble de faits concordant avec la théorie du renversement des phases dans l'étude de l'antagonisme lipoïdique. La réunion de ces faits constitue l'essentiel de la publication de R. DEGKWITZ (1). Cet auteur pense que l'antagonisme lipoïdique devrait plutôt être appelé antagonisme entre les colloïdes hydrophiles et hydrophobes de la matière vivante. Les lécithides et les protéides interviendraient dans une série de faits *in vitro* et *in vivo* comme les antagonistes des stérols et leurs esters.

Les faits constatés *in vitro* sont : 1° le cholestérol empêcherait et les lécithides activeraient l'hémolyse par la toxine tétanique ou par le venin de Cobra ; 2° le cholestérol activerait et les lécithides diminueraient la vitesse de chute des globules rouges ; 3° le cholestérol empêcherait, le lécithide activerait la coagulation sanguine ; 4° l'albumine, le lécithide et l'oléate de sodium diminueraient, tandis que le cholestérol, les cholestérides et le trioléide augmenteraient la résistance globulaire (SPRANGER (2)).

Les faits constatés *in vivo* sont : 1° l'antagonisme entre le cholestérol et le lécithide dans l'hydratation des tissus (A. MAYER et G. SCHAEFFER (3), R. BRINKMAN et E. van DAM (4) ; 2° la diurèse pourrait être influencée considérablement par le lécithide ou par le cholestérol, si on les administraient à l'animal dans un état de dispersion suffisante (R. DEGKWITZ).

(1) DEGKWITZ, *Ergebnisse d. Physiol.*, 32, 821 (1931).

(2) W. SPRANGER, *Biochemische Ztschr.*, 218, 341 (1931).

(3) A. MAYER et G. SCHAEFFER, *Jour. de physiol. et de path. gén.*, 15, 1 (1914).

(4) R. BRINKMAN et E. van DAM, *Biochemische Ztschr.*, 108, 35 (1920).

Critique des faits.

Cette théorie semble être très attrayante, elle a cependant plusieurs points faibles. En ce qui concerne l'antagonisme lipoprotéidique les résultats expérimentaux dans le domaine des faits biologiques n'étaient jamais tout à fait sans ambiguïté. L'un des auteurs a démontré un fait, l'autre le contraire et tout est encore sujet de discussion. L'interprétation de ces résultats d'autre part peut être différente de celle que nous avons précitée. La question de renversement des phases pourrait être remplacées par des changements de dispersion des protéides protoplasmiques, par des changements que subit l'équilibre de DONNAN, comme il a été supposé par J. LOEB (1). Les travaux modernes tendent d'ailleurs à donner une grande importance aux changements de dispersion des protéides dans les manifestations vitales. La matière vivante pourrait ainsi avoir une constitution homogène avec un système lipoprotéidique. La théorie qui admet un système diphasique : graisse-eau restera toujours peu probable. Elle doit en effet compter avec une couche monomoléculaire orientée des protéides, une hypothèse qui est assez difficile de concilier avec notre conception actuelle de ces corps.

Théorie des lipides vivants.

Mentionnons enfin quelques faits curieux qui ont donné naissance à une troisième hypothèse pour l'explication du comportement spécial des lipides des tissus vivants.

B. HANSTEEN-CRANNER (2) observe le premier la mise en liberté de phosphatides solubles dans l'eau par les végétaux coupés immergés dans l'eau. Ces solutions, contenant des quantités plus ou moins importantes de phosphatides, étaient absolument limpides et ne contenaient pas trace de protéides. Ces phosphatides sont unis sous forme de complexes colloïdaux avec d'autres

(1) J. LOEB, *La théorie des phénomènes colloïdaux*, édit. F. ALCAN, Paris, (1925).

(2) B. HANSTEEN CRANNER, *Ber. d. deutschen bot. Ges.*, 37, 380 (1919).

constituants (sucre, stérols, etc.) ; ce sont des substances excessivement labiles qui s'oxydent très facilement. Après dessiccation ils deviennent solubles dans l'éther et leur solution éthérée évaporée laisse un résidu insoluble dans l'eau.

Les recherches de B. HANSTEEN-CRANNER furent vérifiées par V. GRAFE (1).

Ces deux auteurs supposent que les lipides de la matière vivante sont dans un état physico-chimique spécial leur permettant d'être solubles dans l'eau. Cet état spécial caractériserait les lipides vivants, car la mort et les réactifs dénaturent les lipides et leur font perdre la propriété d'être solubles dans l'eau.

HANSTEEN-CRANNER et V. GRAFE ne discutent pas le côté physique du problème, les faits apportés par eux reviendraient cependant à admettre une théorie colloïdale — il ne pourrait s'agir que de lipides pseudosolubles, se trouvant à l'état de dispersion micellaire. Dans les résultats de ces auteurs ce qu'il y a de particulier c'est que les pseudosolutions aqueuses paraissent être formées de lipides seulement. Ces faits nécessitent encore d'autres vérifications, mais en tout cas ils donnent une voie neuve très intéressante pour les recherches qui tendent à élucider la structure de la matière vivante.

Etude des lipides contenus dans le sérum sanguin.

Toutes les discussions théoriques mentionnées ci-dessus, étaient basées sur des recherches effectuées sur les tissus solides des animaux et des végétaux. Des phénomènes d'adsorption pouvaient être invoqués pour expliquer tout au moins en partie le comportement des lipides enclavés dans les cellules. Les expériences sur ce matériel sont entourées de nombreuses difficultés dues à la présence de squelettes demi-solides constitués par les protéides et les polyosides des cellules mortes. Le milieu intercellulaire du tissu sanguin, le plasma, auquel nos recherches

(1) V. GRAFE. *Biochemische Ztschr.*, **159**, 144 (1925) ; V. GRAFE et V. HORVATH. *Biochemische Ztschr.*, **159**, 449 (1925) ; V. GRAFE et H. MAGISTRIS. *Biochemische Ztschr.*, **162**, 366 (1925) et **176**, 266 (1927).

personnelles se sont principalement adressées, constitue un matériel d'études idéal pour les travaux expérimentaux.

Caractères physico-chimiques des lipides du sérum.

Le sérum sanguin présente l'aspect d'une solution homogène, dans laquelle l'ultramicroscope est incapable de déceler des discontinuités, cette solution homogène contient cependant des quantités non négligeables de graisses. Le taux des lipides des sérums des mammifères varie entre 3 et 8 p. 1000. Ces lipides sont constitués par un mélange de cholestérides, de phosphatides, de glycérides et de traces de cholestérol libre. Ces substances sont solubles dans l'éther et insolubles dans l'eau. Les graisses du sérum sont cependant en pratique complètement inextrac-tibles par l'éther (l'éther n'extrait dans les conditions normales que 0,8 à 1 p. 100 des graisses totales du sérum). On a là tous les caractères des substances lipoidiques vivants, mais dans un système formant solution homogène.

Un fait est fondamental : Il existe des lipides en solution homogène dans l'eau. L'explication physique de ce fait serait très importante, les recherches sur ce problème ne sont cependant pas nombreuses. Les chercheurs se sont souvent occupés des fractions protéidiques du sérum, mais le problème de l'état physique des lipides sériques ne s'est présenté à leur esprit que tout à fait fortuitement au cours d'études sur les protéides, lors de la constatation de l'entraînement des lipides en quantité plus ou moins abondante par les précipités des protéides.

Le problème des lipides se présentait donc dans la plupart des cas comme une simple étude secondaire au cours de travaux sur les protéides. Un ensemble de recherches éparpillées, très partielles, amena lentement à savoir que les lipides sont entraînés par les protéides dans des précipités réversibles.

*Recherches sur les protéïdes
précisant nos connaissances sur les lipides sériques.
Caractères de solubilité.*

C'est surtout au cours de recherches sur la solubilité des protéïdes ou sur leurs teneurs en phosphore et en cholestérol que des faits intéressant le problème des lipides ont été mis en évidence.

HAMMARSTEN (1) est le premier à penser que les caractères de solubilité des divers protéïdes sériques ne suffisent pas pour caractériser les fractions protéïdiques, car il soupçonne une influence des impuretés adsorbées par les précipités protéïdiques et tout particulièrement des lipides.

Phosphore des protéïdes.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le phosphore des protéïdes préoccupait beaucoup les chercheurs. HOPPE-SEYLER (2) mentionne déjà que son assistant, ARONHEIM, a pu isoler du sérum de Cheval un protéïde appartenant au groupe des globulines qui contenait du phosphore extractible par l'alcool-éther, donc du lécithide.

HARDY (3) et HASLAM (4) trouvent de même que les globulines contiennent du phosphore en quantité appréciable et que ce phosphore se concentre dans les fractions qui précipitent par dialyse et acidification (euglobulines). Par la méthode qu'ils emploient ces auteurs n'arrivent cependant pas à extraire par l'alcool-éther la totalité de ce phosphore, ils supposent donc que les globulines contiennent d'autres produits phosphorés que le lécithide.

Depuis ce temps plusieurs auteurs (en particulier SØRENSEN (5)) ont pu vérifier que par la méthode de KUMAGAWA on arrive bien

(1) O. HAMMARSTEN. *Ergebnisse der Physiol.*, 1, 330 (1902).

(2) F. HOPPE-SEYLER. *Med. Chem. Untersuchungen*. Berlin (1866).

(3) W. B. HARDY. *Jour. of Physiol.*, 33, 251 (1905).

(4) H. C. HASLAM. *The Biochemical Jour.*, 7, 492 (1913).

(5) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 16, n° 8 (1925).

à extraire la totalité du phosphore contenue dans les protéides du sérum. Les résultats contradictoires trouvés par les auteurs précités sont dus à l'imperfection de leur méthode. Ils extraient par l'éther bouillant seul ou par l'alcool-éther à froid ou bien encore traitent par l'alcool chaud des produits préalablement desséchés; par ces techniques imparfaites ils ont laissé une partie des lécithides dans les protéides.

HARDY a trouvé, puis HASLAM a vérifié que le phosphore ne caractériserait que l'euglobuline tandis que la pseudoglobuline en serait pratiquement exempte. Ce fait a donné naissance ultérieurement à une théorie sur la nature des euglobulines.

HANDOWSKY et WAGNER (1) d'une part et H. CHICK (2) d'autre part supposent que l'euglobuline serait formée d'une réunion de la pseudoglobuline avec le lécithide. Si l'on mélange du lécithide avec de la pseudoglobuline il se forme de nouvelles quantités de globulines insolubles dans l'eau distillée. H. CHICK refuse d'ailleurs de considérer l'euglobuline comme une vraie lécithalbumine parce que la teneur en phosphore des euglobulines est extrêmement variable.

Stérols contenus dans les précipités protéidiques.

On a depuis longtemps vu que des lécithides précipitent avec les protéides du sérum. On a trouvé bien plus tardivement, que des stérols précipitent aussi avec les diverses fractions des protéides sériques.

HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE (3) concluent dans leurs recherches que 20 à 30 o/o des stérols du plasma de bœuf seraient liés aux globulines. Ces auteurs extraient le plasma de bœuf au moyen d'éther en agitant très énergiquement pendant plusieurs heures. Cette action mécanique aussi intense pouvait introduire un changement profond dans le système sérique (système de structure physique très labile). A notre avis la valeur de leurs conclusions n'est donc pas certaine.

(1) HANDOWSKY et WAGNER. *Biochemische Ztschr.*, **31**, 32 (1911).

(2) H. CHICK. *The Biochem. Jour.*, **8**, 404 (1914).

(3) HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE. *Archiv f. d. ges. Physiol.*, **210**, 63 (1925).

A. THEORELL et T. HUGO (1) trouvent que la majorité des stérols du sérum est entraînée dans des précipitations réversibles avec les protéides. Ils supposent des liaisons physico-chimiques qui préexisteraient dans le sérum entre les protéides et les lipides.

TROENSEGAARD et KOUDAH (2) au cours de leurs travaux sur les produits d'acétylation des protéides du sérum trouvent parmi les produits d'acétylation des globulines des carbures d'hydrogène identiques à ceux dérivant du cholestérol par acétylation. Pour vérifier ce résultat qui leur semble curieux, ils font une étude quantitative sur l'extrait alcool-étheré de leurs fractions protéidiques : albumine et globuline. Ils précipitent les globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, ils acidifient les eaux-mères des globulines par l'acide sulfurique pour avoir pH 4,8 et obtiennent les albumines cristallisées. Les albumines et les globulines précipitées, lavées et redissoutes, sont dénaturées par l'alcool et une fois coagulées, déshydratées à l'alcool absolu. Le produit pulvérulent est extrait à l'éther froid. Dans ces conditions on n'a extrait des globulines que des traces de lipides (0,02 gr. par litre) qui seraient constitués par un mélange de cholestérol et de phosphatides. Des albumines les auteurs extraient une quantité plus considérable de graisses (1 gr. par litre à peu près) constituées de même par un mélange de cholestérol et de lécithides (0,33 gr. de lécithides pour 0,66 gr. de cholestérol). Les produits d'acétylation des globulines contiennent cependant encore des hydrocarbures provenant du cholestérol. Sans faire d'autres recherches les auteurs tendent à admettre que le cholestérol est un groupement prosthétique des globulines.

On doit faire des objections très graves à ces recherches. Les auteurs ont obtenu leurs extraits lipoïdiques par un traitement peu prolongé à l'alcool et l'éther et ils auraient dû savoir que dans ces conditions ils n'extraient qu'une fraction des lipides totaux. Ce fait, constaté bien souvent avant eux, ne suffit pas pour faire admettre l'existence d'hétéroprotéides cholestériques. Des quantités importantes de lécithides précipitent d'ailleurs également avec les globulines et TROENSEGAARD et KOUDAH les

(1) THEORELL et HUGO. *Biochemische Ztschr.*, **175**, 297 (1926).

(2) TROENSEGAARD et KOUDAH. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **153**, 111 (1926).

ont dû laisser dans le précipité protéidique. En observant leur mode d'opération on doit *a priori* supposer que leurs chiffres restent bien au-dessous de la vérité en ce qui concerne la quantité de lipides précipités avec les différentes fractions protéidiques.

J. A. GARDNER et H. GAINSBOROUGH (1) opèrent sur le sérum humain et concluent que 20 o/o à peu près des stérols totaux seraient unis d'une façon plus énergique avec les protéides et plus particulièrement avec les euglobulines.

Pouvoir rotatoire des protéides du sérum.

Certaines recherches effectuées sur le pouvoir rotatoire des protéides du sérum ont conduit accessoirement à des résultats intéressants sur les lipides sériques. Il était, en effet, nécessaire pour ces recherches d'obtenir des protéides non dénaturés, mais exempts de graisses, car les graisses introduisent une cause d'erreur dans la détermination du pouvoir rotatoire des protéides. Les méthodes classiques employées pour l'extraction des lipides dénaturent les protéides et modifient leur pouvoir rotatoire.

HARDY et GARDINER (2) trouvent que les actions combinées de l'alcool et de l'éther à basse température peuvent extraire la presque totalité des lipides du sérum sans dénaturer les protéides. YOUNG (3) obtient par une méthode analogue une albumine purifiée dont le rendement de cristallisation est bien supérieur à celui de l'albumine primitive.

Remarquons que ces méthodes consistent dans des extractions très prolongées par l'alcool absolu et l'éther anhydre à froid dans un appareil de SOXHLET après déshydratation des protéides par l'alcool absolu à très basse température (-6° à -8°). Dans ces conditions les protéides rigoureusement anhydres ne sont pas dénaturés à froid et les lipides sont extraits presque complètement.

(1) J. A. GARDNER et H. GAINSBOROUGH. *The Biochemical Jour.*, **21**, 136 (1927).

(2) W. B. HARDY et Mme S. GARDINER. *Journ. of Physiol.*, **40** (1910); *Proc. physiol. soc.*, LXVIII.

(3) E. O. YOUNG. *Proc. Roy. Soc. London*, B, **93**, 15 (1922).

SØRENSEN reprend la méthode élaborée par HARDY et YOUNG et fait une étude approfondie des protéides débarrassés des lipides par l'alcool-éther à froid (1). De ses travaux paraît résulter un fait capital :

Les caractères de solubilité des différentes fractions des protéides sériques paraissent persister sans lipides tels qu'ils étaient avec lipides. En particulier la globuline insoluble et la globuline soluble dans l'eau distillée existent aussi pour les protéides du sérum débarrassés de graisses.

Travaux de M. A. MACHEBŒUF.

Les travaux cités jusqu'ici ne s'occupaient que secondairement des lipides du sérum et ils ne pouvaient donner qu'une idée vague et confuse du fait que des liaisons doivent exister entre les protéides et les lipides du sérum. M. A. MACHEBŒUF (2) s'attaque directement à l'étude de ces liaisons et obtient des résultats très intéressants.

GARDNER et GAINSBOROUGH (3) avaient déjà remarqué que la majorité des graisses reste en solution lorsqu'on précipite les globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. On obtient ainsi une solution limpide des albumines contenant la majorité des graisses du sérum en présence du sulfate d'ammonium à demi-saturation — la « pseudo-solution » des graisses du sérum doit être très stable pour résister à des agents précipitants aussi actifs.

Ce fait fut le point de départ des travaux de M. A. MACHEBŒUF. Son but était de fractionner le système constitué par l'albumine du sérum et les lipides qui restent avec elle en solution. L'auteur trouve avant tout que la totalité des albumines et pratiquement la totalité des lipides sont précipitées à pH 3,8 en présence d'un excès de sulfate d'ammonium. Le précipité séparé

(1) S. P. L. SØRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 18, n° 5 (1930).

(2) M. A. MACHEBŒUF. *Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguin*. Thèse de doctorat ès Sciences, Paris, (1928); *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XI, 270 (1929) et XI, 485 (1929).

(3) GARDNER et GAINSBOROUGH. *The Biochem. Journ.*, 21, 130 (1927).

des eaux-mères par centrifugation peut être redissous en solution limpide contenant la totalité des graisses présentes par un peu d'eau et d'alcali; l'entraînement des graisses par les protéides se fait donc d'une façon réversible.

M. A. MACHEBŒUF prend les albumines et les lipides redissous à la neutralité comme point de départ de son fractionnement. Il acidifie à nouveau jusqu'à pH 3,7-3,8 par l'acide sulfurique dilué, un nouveau précipité abondant apparaît. Il répète cette même opération plusieurs fois en dosant à chaque fois la teneur des eaux-mères et des précipités en protéides, phosphore, cholestérol et acides gras. Au cours des précipitations et dissolutions successives la majorité des protéides et une partie des graisses passe dans les eaux-mères qui deviennent toujours de moins en moins concentrées en sulfate d'ammonium. Une quantité appréciable d'albumine précipite cependant constamment à pH 3,8 et cette fraction s'enrichit progressivement en lipides. Le rendement des eaux-mères diminue progressivement et la constitution des précipités tend vers une limite. On obtient ainsi à partir de la septième précipitation des précipités qui ont une teneur constante en phosphore, cholestérol, acides gras et protéides. La teneur en lipides totaux de ce précipité limite est énorme (presque 50 p. 100 de son poids) et malgré cette teneur en graisses la substance a une solubilité extraordinaire dans l'eau, où elle forme des solutions absolument limpides.

Ces travaux sont les premiers qui aient conduit à isoler un complexe où protéides et lipides étaient en proportions invariables, bien déterminées. Ce résultat est aussi étonnant que l'était peu l'absence de constance de constitution des complexes lipoprotéiques trouvée par les autres auteurs. La variabilité du phosphore euglobulinique avait même conduit H. CHICK (1) à nier l'existence d'un composé chimique lécithalbuminique dans les euglobulines. Nous savons actuellement en effet que les différentes fractions de protéides évoluent comme des mélanges complexes, on ne doit donc pas s'attendre à trouver des rapports de constituants invariables dans ces mélanges.

La constitution constante du complexe de MACHEBŒUF est une preuve contre l'hypothèse qui admettait que les phénomènes de

(1) H. CHICK. *The Biochem. Journ.*, **8**, 404 (1914).

précipitation réversible des lipides par les protéïdes étaient dus à une adsorption simple des lipides par les protéïdes.

La nature de ce complexe reste un problème délicat que l'on ne peut pas résoudre pour le moment. SÆRENSEN (1) sans se prononcer définitivement, tend à admettre que les constituants de ce complexe sont réunis par des forces physiques. Il est conduit à cette supposition par le fait que le complexe est détruit par l'alcool-éther à froid. Il ne nous semble pas cependant que ce fait soit une preuve décisive contre la possibilité de liaisons chimiques. Ce n'est pas la stabilité d'un corps envers les réactifs qui décide de sa nature. C'est ainsi qu'un cristal peut maintenir son état physique vis-à-vis de certains réactifs avec bien plus d'énergie que ne peut le faire une substance pour sa constitution moléculaire (cas d'un sel ionisé dont l'un des ions est insolubilisé par un réactif).

SÆRENSEN fait une autre objection : Le fractionnement à pH 3,8 aurait pu produire des changements irréversibles et donner naissance à une nouvelle fraction qui ne préexistait pas dans l'albumine du sérum de Cheval. SVEDBERG et SJØERGEN (2) démontrent d'ailleurs qu'au-dessous de pH 4 et au-dessus de pH 9 les protéïdes du sérum subissent une fragmentation réversible. Il devient ainsi vraisemblable que le complexe de MACHEBŒUF est libéré de l'ensemble « albumine » au cours du fractionnement à pH 3,8. Il est plus logique cependant de supposer qu'il préexistait dans l'albumine du sérum et qu'il a été libéré de ses attaches physiques par le fractionnement.

Recherches sur le sérum humain normal et pathologique.

M. A. MACHEBŒUF en collaboration avec R. WAHL et moi-même (3) a continué l'étude des précipités lipoprotéïques dans

(1) S. P. L. SÆRENSEN. *C. R. du laboratoire Carlsberg.*, vol. 18, n° 5 (1930).

(2) The SVEDBERG et B. SJØERGEN. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 52, 2855 (1930).

(3) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 486 et 736 (1931); M. A. MACHEBŒUF, R. WAHL et G. SANDOR. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 504 (1931); M. A. MACHEBŒUF et G. SANDOR. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 745 (1931).

le cas du sérum humain (normal et pathologique). Ces auteurs vérifient que dans le cas du sérum humain, comme dans celui du sérum de cheval la presque totalité des graisses précipite avec les protéides.

Les auteurs ont étudié les rapports quantitatifs entre les lipides et les protéides contenus dans les diverses fractions protéidiques séparées par le sulfate d'ammonium. La teneur en lipides des diverses fractions se trouve être assez caractéristique. La constitution des lipides qui précipitent avec une fraction donnée, paraît être de même assez bien déterminée. Les changements que subissent les rapports quantitatifs lipides sur protéides peuvent même caractériser certains états pathologiques. Les protéides du sérum apparaissent ainsi dans ces travaux comme des systèmes lipoprotéiques.

En faisant l'étude comparative de l'effet tampon de l'albumine du sérum normal et de celle du sérum pathologique M. A. MACHEBŒUF et moi-même (1) démontrent que les lipides contenus dans les systèmes lipoprotéiques influent profondément sur les propriétés physico-chimiques des protéides. L'effet tampon des protéides riches en lipides est en effet augmenté d'une façon considérable par rapport aux protéides moins riches en graisses.

Les recherches portèrent sur le sérum de malades atteints de néphrose lipoïdique, affection caractérisée du point de vue sérique par une augmentation considérable de la teneur en graisses des albumines. En comparant la courbe de titration de ces albumines excessivement riches en graisses à la courbe de titration des albumides du sérum des sujets normaux on observe un effet tampon bien plus considérable des albumines du sérum des malades. Cette augmentation conserve même un caractère spécifique, elle n'existe en effet que pour le côté alcalin du point isoélectrique. Ce fait impose l'hypothèse de l'intervention d'un groupement chimique bien défini dans les molécules de lipides. Ce groupement chimique doit être de caractère basique, ce qui donne l'idée de le chercher dans la base constitutive du lécithide : la choline.

Cette intervention active des lipides du sérum dans l'ionisa-

(1) M. A. MACHEBŒUF et G. SANDOR. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 736 (1931).

tion dans l'eau est un fait très intéressant du point de vue physico-chimique comme du point de vue physiologique. La modification profonde que paraît subir l'ionisation de l'eau par les lipides du sérum, fait supposer que ces lipides forment une phase unique avec le milieu dispersant aqueux dans le sérum. Dans un milieu hétérogène : graisse-eau, les lipides ne pourraient en effet pas influencer sensiblement sur l'ionisation de la phase aqueuse. Ce fait d'autre part a une importance physiologique par l'influence de l'ionisation sur la tension osmotique des colloïdes du sérum. Cette tension osmotique dépend au fond de l'équilibre de DONNAN qui lui est conditionné par l'ionisation des colloïdes. Les travaux de STARLING (1) et GOVÆRTS (2) accordent une importance capitale à la tension osmotique des colloïdes du sérum dans l'équilibre de l'hydratation des tissus. Les graisses du sérum peuvent ainsi avoir un rôle dans le métabolisme aqueux de l'organisme.

M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL (3) étudient l'extraction étherée prolongée du sérum. L'éther qui pendant un temps relativement court (12 à 24 heures) est incapable d'extraire des quantités appréciables des lipides du sérum, extrait à la longue une certaine proportion de ces graisses (50 o/o à peu près en 6 mois). Cette extraction pour le sérum humain normal paraît tendre vers une limite. Au bout de deux mois l'extraction a déjà presque atteint la quantité que l'on extrait au bout de 6 mois. L'extraction était conduite dans des entonnoirs à décantation en changeant l'éther tous les deux ou parfois tous les trois jours et en agitant l'entonnoir très doucement chaque fois. Ce résultat met encore une fois en évidence l'extraordinaire stabilité des lipides dans la phase aqueuse homogène : sérum ; après 6 mois d'épuisements répétés par de l'éther il reste encore dans le sérum 50 o/o environ des lipides qui s'y trouvaient.

(1) E. H. STARLING. *Jour. of Physiol.*, **19**, 312 (1896).

(2) P. GOVÆRTS. *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 678 (1923), **93**, 441 (1925) ; *Bull. Ac. Med. Belgique*, 1924, n° 3.

(3) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 736 (1931).

TROISIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS *

(*) Les travaux qui sont rapportés ici ont été effectués dans le laboratoire du docteur Machebœuf à l'Institut Pasteur ; pour certains nous avons été aidé par P. Goret et B. Delage et nous tenons à les remercier ici.

CHAPITRE PREMIER

SYSTÈME LIPOPROTÉIQUE DU SÉRUM

Les travaux cités ci-dessus nous ont montré que tout au moins la majorité des lipides du sérum doit être liée aux protéides dans des systèmes lipoprotéiques. Nous avons cherché une explication physique possible de la nature de ces liaisons en faisant une étude physico-chimique serrée de la question.

Quelle quantité de graisses est entraînée en précipitation réversible avec les protéides du sérum ?

Il est avant tout d'une importance capitale de vérifier du point de vue quantitatif la question de l'entraînement mutuel des lipides et des protéides. M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL (1) ont trouvé que pour le sérum humain et le sérum de Cheval la presque totalité des graisses du sérum précipite avec les protéides. Nous avons étudié sur ce point plusieurs sérums appartenant à différentes espèces (Cheval, Mouton, Chien). La méthode employée par nous est essentiellement celle de M. A. MACHEBŒUF (2) et il est capital d'insister sur ce point parce que les résultats peuvent dépendre dans une certaine mesure de la méthode employée.

Description de la méthode.

1° Fractionnement des protéides.

Les *globulines* sont précipitées en ajoutant au sérum non dilué un volume égal d'une solution saturée et neutre (*) de sul-

(1) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 486 (1931).

(2) M. A. MACHEBŒUF. *Thèse doctorat ès Sciences*, Paris (1928).

(*) La solution saturée de sulfate d'ammonium est neutralisée par de l'ammoniaque concentré jusqu'au virage (bleu verdâtre) du bleu de bromothymol, virage apprécié à la touche.

fate d'ammonium. Après une demi-heure on sépare le précipité par centrifugation. Les eaux-mères sont décantées et le précipité est dissous dans un volume connu d'eau distillée (il faut à peu près une quantité d'eau distillée correspondant aux deux tiers du volume primitif du sérum pour arriver dans tous les cas à une dissolution intégrale des globulines). Les globulines sont précipitées à nouveau par du sulfate d'ammonium ajouté en volume égal au volume d'eau distillée employée pour la dissolution. Après une demi-heure on sépare le précipité par centrifugation et on ajoute les eaux-mères décantées aux eaux-mères de la première précipitation.

Précipitation des *albumines* : dans la méthode employée par M. A. MACHEBŒUF (1) on ajoute aux eaux-mères des globulines qui sont déjà mi-saturées en sulfate d'ammonium, encore de la solution saturée neutre du sulfate d'ammonium jusqu'au début de précipitation. On ajoute ensuite une solution d'acide sulfurique à peu près $n/5$ jusqu'au début de virage du rouge Congo (violet). On attend une heure à peu près et on centrifuge.

Le virage est assez difficile à apprécier et le plus souvent on est obligé d'acidifier par tâtonnement. Nous nous sommes efforcés à mettre au point une méthode standardisée, où, l'on ajoute pour un même volume de sérum toujours le même volume de solution saturée de sulfate d'ammonium et après toujours le même volume d'acide dilué. Pour ce faire il fallait vérifier trois points :

1° En maintenant les conditions constantes les variations dans le pH final pour le sérum de différents individus ne doivent pas être considérables ;

2° Au-dessous de pH 3,7 les protéides ne doivent pas se dissoudre quand l'acidité augmente ;

3° Au-dessous de pH 3,7 l'augmentation de l'acidité ne doit pas avoir une influence sur la quantité de graisses qui précipitent.

Nous avons vérifié que : a) on peut choisir la quantité d'acide de telle façon que le pH reste pour le sérum d'une même espèce entre 3,4 et 3,7 ; b) les protéides et les graisses ne se dissolvent pas si l'acidité dépasse pH 3,7, si toutefois la concentration finale en sulfate d'ammonium reste constante.

(1) M. A. MACHEBŒUF. *Thèse doctorat ès Sciences*, Paris, 1928.

Nous étions ainsi autorisés à employer une méthode standardisée :

Méthode standard pour le fractionnement du sérum.

Pour 10 centimètres cubes de sérum nous avons ajouté 10 centimètres cubes de solution saturée neutre de sulfate d'ammonium pour précipiter les globulines. Le précipité de globulines fut dissous dans 6,6 centimètres cubes d'eau distillée et précipité par volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium. Le volume des eaux-mères réunies a mesuré 27 à 28 centimètres cubes (*); à ces eaux-mères nous avons ajouté encore 16 centimètres cubes de solution saturée de sulfate d'ammonium et :

a) 6 centimètres cubes d'acide sulfurique N/5 dans le cas du sérum de Cheval;

b) 6,5 centimètres cubes d'acide sulfurique N/5 dans le cas du sérum de Mouton et de Lapin.

Après l'acidification les albumines furent séparées par centrifugation au bout de 15 minutes.

La précipitation était, dans tous les cas étudiés, quantitative et les eaux-mères séparées par centrifugation, étaient d'une limpidité absolue. Les albumines maintenues dans un tel milieu acide pendant la durée de la précipitation, n'ont subi apparemment aucune modification dans leurs propriétés physico-chimiques.

Extraction des graisses et déterminations quantitatives des protéides et des lipides.

Par l'ensemble des opérations énumérées jusqu'ici on obtient séparément les globulines et les albumines à l'état de précipités recueillis par centrifugation. Ces précipités contiennent, nous le savons, des lipides qui ont accompagné les protéides au cours de leur séparation.

(*) Le précipité des globulines emprisonne donc dans son gel sensiblement un volume de sulfate d'ammonium mi-saturé égal au $\frac{2}{3}$ du volume primitif du sérum.

Les globulines sont dissoutes dans la quantité minima d'eau distillée nécessaire pour avoir une dissolution intégrale. Les albumines sont délayées dans un peu d'eau distillée puis dissoutes par les quelques gouttes d'ammoniaque juste nécessaires pour opérer la dissolution.

Pour coaguler les protéides et permettre l'extraction des graisses, nous avons ajouté aux solutions protéidiques limpides un excès d'alcool (à peu près 4 à 5 fois le volume de la solution aqueuse d'alcool à 96°), puis porté à l'ébullition sur un bain-marie pendant une demi-heure, afin de dénaturer complètement les protéides. Le coagulum transvasé dans un appareil de KUMAGAWA est enfin extrait pendant 7 heures par de l'alcool bouillant puis pendant deux heures par de l'éther bouillant.

Les solutions éthérées et alcooliques sont évaporées dans le vide. Le résidu est repris par de l'éther anhydre, la solution est filtrée puis placée dans une fiole de FOURNEAU tarée. L'éther est évaporé à basse température et la fiole maintenue dans un dessiccateur jusqu'à poids constant. Le poids des différents extraits permet de calculer les teneurs en lipides des globulines et des albumines.

Le contenu des cartouches, constitué par les protéides coagulés et délipidés fut transvasé par un jet d'alcool sur un filtre d'Iéna taré, sur lequel les protéides furent lavés à plusieurs reprises par de l'eau bouillante. Le filtre d'Iéna et le précipité furent ensuite maintenus dans une étuve à 110° jusqu'à poids constant. Les poids ainsi déterminés indiquaient les quantités de protéides délipidés contenus dans les précipités d'albumines et de globulines.

Pour déterminer les protéides et les lipides totaux on a coagulé un volume connu (10 cm³) du sérum par un excès d'alcool à chaud et le coagulum fut traité de la façon indiquée ci-dessus.

Résultats obtenus.

Nos chiffres, réunis ci-dessous, montrent que la très forte majorité des graisses du sérum est entraînée en précipitations réversibles avec les protéines. En général 4 à 10 o/o seulement

des lipides totaux ne sont pas précipités avec les albumines, ni avec les globulines :

TABLEAU I

	Cheval	Mouton	Chien
Lipides entraînés avec les globulines.	2,3	1,12	1,44
Lipides entraînés avec les albumines.	3,8	1,43	4,93
Lipides totaux	6,4	2,74	6,72
Pertes o/o	5	7	7
Les chiffres sont exprimés en grammes par litre de sérum.			

Il y a de rares cas cependant, où une fraction relativement grande des lipides n'est pas entraînée avec les protéides. Voici par exemple le cas du mouton N° II, que nous avons pu observer après plusieurs saignées. Dans ce cas 30 p. 100 à peu près des lipides totaux ne furent pas précipités avec les protéides. Les eaux-mères de précipitation des globulines, comme celles des albumines étaient cependant absolument limpides. Les eaux-mères de précipitation des albumines étaient d'autre part rigoureusement exemptes de toute trace de protéides, ce qui excluait la possibilité de l'existence de fractions lipoprotéïques non précipitables dans les conditions de nos expériences. Nous poursuivons encore l'étude de ce fait, mais nous pouvons déjà en tout cas supposer que d'autres forces que des liaisons lipoprotéïques peuvent éventuellement intervenir aussi dans la dispersion des lipides du sérum.

TABLEAU II
Mouton n° 2.

Saignées	1	2	3	4
Lipides entraînés avec les globulines	0,62	0,60	0,62	0,43
Lipides entraînés avec les albumines	1,33	1,35	1,44	1,02
Lipides totaux	2,77	2,71	3,23	2,30
Pertes o/o.	33	29	36,5	36
Les chiffres sont exprimés en grammes par litre de sérum.				

Par une méthode différente on peut obtenir des résultats fondamentalement différents. Si l'on poursuit par exemple trop longtemps les fractionnements ou si l'on utilise des réactifs trop actifs (tel l'acétone), des lipides peuvent se détacher des molécules de protéides. Il n'en faudrait cependant pas tirer des conclusions sur la nature des liaisons qui auraient pu préexister dans le sérum. Le système sérique est en général très fragile et des fractionnements poursuivis pendant trop longtemps peuvent dénaturer les protéides et modifier profondément leurs propriétés physico-chimiques — c'est ainsi par exemple que les euglobulines s'insolubilisent progressivement lorsqu'on essaye de les purifier (1).

***Teneur en graisses des globulines et des albumines
et constitution de ces graisses.***

Par la méthode décrite ci-dessus nous avons obtenu l'extrait lipoïdique des globulines et des albumines. Nous réunissons ci-dessous quelques chiffres qui montrent la teneur en graisses des globulines et des albumines de l'homme et de différentes espèces animales et la constitution de ces graisses.

Comme on le voit, ces chiffres varient fortement pour les différentes espèces, ils varient aussi, mais moins notablement, pour les différents individus appartenant à une même espèce et dans ce cas ils conservent leur ordre de grandeur. Nous reproduisons ci-dessous les chiffres obtenus pour 4 Moutons différents :

Le chiffre le plus constant dans une même espèce animale est le rapport entre les lipides de l'albumine et les albumines (index lipoalbuminique de MACHEBŒUF et WAHL) (2). Le rapport lipo-protéidique des globulines varie par contre assez fortement.

Dans les cinq espèces citées ci-dessus il y a des différences très intéressantes à noter. Chez l'Homme, le Cheval et le Chien le rapport lipoprotéidique des albumines est bien plus élevé que celui des globulines, la grande majorité des graisses du sérum précipite en effet avec les albumines. Chez le Mouton et le Lapin

(1) S. P. L. SØRENSEN, *C. R. du laboratoire Carlsberg*, vol. 18, n° 5 (1930).

(2) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 486 (1931).

TABLEAU III

	Homme	Cheval	Mouton	Chien	Lapin
Globulines					
Protéides.	45,6	39,7	30,3	65	13,9
Lipides	2,3	2,3	1,3	0,76	1,6
Rapport lipides sur protéides .	0,05	0,056	0,042	0,01	0,12
Phosphore lipidique des globu- lines o/oo	0,34	0,74	0,82	0,83	0,6
Insaponifiables o/o des lipides des globulines	26	19	30	32	22
Acides gras o/o des lipides des globulines.	60	60	66	62	65
Albumines					
Protéides.	47	26,8	40,9	29	39,3
Lipides	3,6	3,8	1,5	3,9	1,65
Rapport lipides sur protéides .	0,077	0,14	0,037	0,14	0,042
Phosphore lipidique des globu- lines o/oo	0,6	1,2	0,4	1,6	0,6
Insaponifiables o,o des lipides des globulines	33	22	34	16	20
Acides gras o/o des lipides des albumines.	55	58	45	76	60
Les chiffres sont calculés en grammes par litre de sérum. Les dosages du phosphore furent effectués par la méthode de M. A. MACHEBŒUF (1), le dosage des acides gras et de l'insaponifiable total suivant les indications de LEMELAND (2). (1) M. A. MACHEBŒUF : <i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i>, 8, 464 (1926). (2) LEMELAND : <i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i>, 4, 300 (1922) et 5, 110 (1923).					

TABLEAU IV

Moutons :	N° I	N° II	N° III	N° IV
Rapports lipides des globulines sur protéides des globulines .	1,8	4,2	2,7	3,1
Rapports lipides des albumines sur protéides des albumines .	3,3	3,7	3,8	4,1

il y a un partage équitable entre les globulines et les albumines pour les lipides du sérum, mais comme le Lapin a un sérum relativement très peu riche en globulines, le rapport lipoprotéidique des globulines dépasse chez lui de beaucoup celui des albumines.

Constitution des graisses qui précipitent avec les deux grandes fractions des protéides du sérum : globulines et albumines.

Un fait très important est qu'avec les globulines comme avec les albumines c'est toujours un ensemble complexe de lipides qui précipite ; les stérols, le phosphore et les acides gras y sont toujours présents en quantités très appréciables. Nous allons retrouver ce fait même pour les termes de fractionnement des systèmes lipoprotéidiques. Notons en particulier qu'insaponifiable et phosphore paraissent être à peu près également partagés entre globulines et albumines. Ce fait contredit la théorie colloïdale posée par certains auteurs qui voudraient que les stérols précipitent avec les globulines et les phosphatides avec les albumines.

Teneur en graisses des produits de fractionnement des globulines et des albumines et constitution de ces graisses.

Complexe de Machebœuf.

Le fractionnement des protéides du sérum revient à un fractionnement du système lipoprotéidique, les produits de ce fractionnement contiennent en effet des quantités plus ou moins importantes de graisses.

Nous avons décrit précédemment le fractionnement physico-chimique des albumines du sérum de Cheval effectué par M. A. MACHEBŒUF qui a donné naissance à un complexe lipoprotéidique de constitution bien déterminée. Ce complexe contenait presque 50 p. 100 de son poids de lipides, constitués par un mélange de lécithides et de cholestérides (1).

(1) M. A. MACHEBŒUF, *Thèse doctoral ès Sciences*, Paris, 1928.

Euglobulines et pseudoglobulines.

Nos recherches personnelles se sont adressées aux deux grandes fractions des globulines du sérum, aux euglobulines et aux pseudoglobulines. Nous avons vu que les deux fractions globuliniques peuvent être définies de deux façons différentes et les méthodes d'obtention correspondant à chacune de ces définitions ne conduisent pas rigoureusement aux mêmes résultats. Nous avons cherché à comparer ces méthodes de fractionnement, en étudiant les rendements en protéides et en lipides qu'elles donnaient.

Première méthode de préparation des euglobulines et pseudoglobulines ; méthode de PORGES et SPIRO (1).

A un volume connu de sérum nous avons ajouté un volume moitié moindre d'une solution saturée, neutre de sulfate d'ammonium. Nous avons centrifugé après une demi-heure, puis les eaux-mères furent décantées et le précipité fut dissout dans un volume connu d'eau distillée et précipité à nouveau par un demi-volume de sulfate d'ammonium saturé. Le précipité ainsi obtenu constituait les euglobulines obtenues par précipitations salines suivant la méthode de PORGES et SPIRO. Aux eaux-mères nous avons ajouté le tiers de leur volume d'une solution saturée neutre de sulfate d'ammonium, le précipité fut séparé puis dissout et précipité encore une fois, il constituait les pseudoglobulines de PORGES et SPIRO. Pour déterminer le poids des protéides et des graisses contenus dans les précipités nous avons employé la méthode décrite précédemment (voir la description de la méthode, page 63).

Deuxième méthode de préparation des euglobulines et des pseudoglobulines ; méthode de dialyse.

Les globulines totales (euglobulines et pseudoglobulines) d'un sérum de Cheval furent précipitées par le sulfate d'ammonium

(1) PORGES et SPIRO, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, 3, 277 (1903).

à demi saturation, puis purifiées par quatre précipitations et dissolutions successives dans les mêmes conditions. Le précipité de globulines ainsi obtenu fut divisé secondairement par dialyse en euglobulines et pseudoglobulines. Pour cela il a été dialysé contre de l'eau distillée jusqu'à ce que la réaction de NESSLER fut négative dans le dialysat (*). Le précipité fut séparé par centrifugation, il constituait les euglobulines de MARCUS EMIL (1), tandis que les eaux-mères contenaient les pseudoglobulines de dialyse.

Euglobulines et pseudoglobulines obtenues par précipitation saline.

Ces deux fractions contiennent des lipides à peu près dans la même proportion, mais les teneurs en graisses sont extrêmement variables. Comme exemple, nous donnons ci-dessous les chiffres obtenus sur deux sérums de Chevaux différents :

TABLEAU V

	Cheval I	Cheval II
Globulines totales		
Protéides	39,3	32,77
Lipides	2,22	1,37
Rapport lipides/protéides	0,056	0,042
Euglobulines		
Protéides	23,7	11,47
Lipides	0,76	0,60
Rapport lipides/protéides	0,032	0,052
Pseudoglobulines		
Protéides	15,6	21,3
Lipides	1,46	0,77
Rapport lipides/protéides	0,093	0,036
Les chiffres sont exprimés en grammes par litre de sérum.		

(*) L'eau distillée fut changée trois fois par jour et elle a été fréquemment agitée. Dans ces conditions il fallait en général 4 jours de dialyse pour éliminer toute trace de sulfate d'ammonium.

(1) MARCUS EMIL, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **28**. 559 (1899).

Ces chiffres démontrent sans aucun commentaire que le fractionnement des globulines en euglobulines et pseudoglobulines par précipitation saline donne des fractions lipoprotéïdiques extrêmement variables même dans les conditions physiologiques.

Euglobulines et pseudoglobulines de dialyse.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU VI

Euglobulines de dialyse	
Protéïdes	17,50 gr. par litre
Lipides	1,02 » »
Rapport lipides/protéïdes	0,11
Phosphore lipidique	0,68 o/o
Pseudoglobulines de dialyse	
Protéïdes.	14,20 gr. par litre
Lipides	1,50 » »
Rapport lipides/protéïdes	0,11
Phosphore lipidique	0,6 o/o

Les pseudoglobulines de dialyse contiennent autant de graisses dans leurs précipités que les euglobulines de dialyse. Ces résultats sont une nouvelle preuve de l'inexactitude de l'hypothèse de HAMMARSTEN qui supposait que les propriétés de solubilité des protéïdes sont sous la dépendance des impuretés lipidiques adsorbées. Contrairement à l'idée de HAMMARSTEN et CHICK l'insolubilité des euglobulines dans l'eau ne peut pas être mise sur le compte des graisses qui précipitent avec cette fraction. L'euglobuline n'est certainement pas une union physico-chimique de pseudoglobuline et de lécithide parce que non seulement la pseudoglobuline dans nos expériences contenait autant de graisses que l'euglobuline, mais aussi parce que sa teneur en phosphore était à peu près comparable (phosphore lipidique des euglobulines 0,68 p. 100, phosphore lipidique des pseudoglo-

bulines 0,60 p. 100) ; l'hypothèse de H. CHICK (1) est ainsi définitivement infirmée.

Constitution des fractions secondaires obtenues à partir des euglobulines de dialyse.

Nous avons précipité d'un sérum de Cheval l'ensemble des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, les globulines furent lavées à quatre reprises par dissolutions et précipitations ; les euglobulines et les pseudoglobulines furent ensuite séparées par dialyse. Nous avons obtenu ainsi une euglobuline A et une pseudoglobuline A. L'euglobuline fut dissoute à nouveau dans une solution saline diluée et remise à dialyser jusqu'à disparition complète des sels. De nouvelles quantités de globulines solubles ont pris naissance. On avait ainsi une euglobuline B et une pseudoglobuline B. Le même processus fut répété une troisième fois pour obtenir une euglobuline C et une pseudoglobuline C. Le fractionnement fut arrêté parce que l'euglobuline C ne se dissolvait plus dans les solutions salines diluées. Ces dialyses ont duré chaque fois 4 à 5 jours et les euglobulines précipitées, comme SÆRENSEN l'a déjà remarqué, subissent une évolution lente qui les rend insolubles dans les solutions salines diluées.

Nous avons mesuré chaque fois le volume total de la solution des pseudoglobulines, c'est-à-dire la dilution qu'elles ont prise d'une façon spontanée au cours de la dialyse en présence de l'eau distillée dans des conditions semblables. En connaissant leur quantité totale, on avait ainsi une mesure grossière, indirecte de leur pression osmotique par gramme de protéides en présence de l'eau distillée. Sur le tableau ci-dessous nous exprimons cette dilution en concentration p. 1.000.

(1) H. CHICK, *The Biochem. Jour.*, 8, 404 (1914).

TABLEAU VII

Désignation des fractions analysées	Protéides secs	Lipides	Rapport lipides sur protéides	Dilution par dialyse
Pseudoglobulines				
A	1,67 gr.	0,18 gr.	0,11	7,2 0/00
B	0,32 »	0,02 »	0,056	5,1 »
C	0,10 »	0,004 »	0,04	2,9 »
Euglobulines				
A	2,10 gr.	0,23 gr.	0,11	
B	1,21 »	0,20 »	0,16	
C	0,66 »	0,10 »	0,15	

Les euglobulines C méritent une mention spéciale. Cette fraction avait un aspect très curieux, elle était en effet formée de deux substances d'aspect différent : l'une blanche, pulvérulente et l'autre jaune, visqueuse. La séparation des deux substances a réussi d'une façon mécanique, par un jet de pissette et nous les avons analysées séparément. Dans le tableau ci-dessous la lettre C¹ désigne la substance blanche, pulvérulente, la lettre C² la substance jaune visqueuse.

	Protéides	Lipides	Rapport lipides sur protéides
Euglobuline C ¹ . .	0,54 gr.	0,06 gr.	0,11
Euglobuline C ² . .	0,12 »	0,04 »	0,34

On arrive ainsi dans le fractionnement des globulines à des fractions très riches en graisses et ces fractions se rassemblent dans les parties les moins solubles. Les fractions solubles s'appauvrissent d'ailleurs progressivement en graisses. Ce même fait se retrouve dans le fractionnement des albumines (l'obtention du complexe de MACHEBŒUF) et rend peu probable que la relation entre l'enrichissement en graisses et la diminution de la solubilité soit une pure coïncidence. Dans l'hypothèse d'HAMMARSTEN, nous l'avons vu, l'insolubilité dans l'eau distillée de certaines fractions des protéides du sérum était mise sur le compte des graisses que ces fractions tenaient adsorbées. Cette hypothèse ne

s'applique certainement pas sur les grandes fractions : euglobulines, pseudoglobulines et albumines qui sont toutes également riches en graisses. Dans les fractions secondaires cependant les graisses semblent intervenir en diminuant la solubilité des protéides. Cette différence dans le rôle des lipides dans la solubilité des protéides primitifs et dans celle des fractions protéïdiques secondaires pourrait peut-être trouver son explication dans un changement de structure physique que subissent les protéides au cours des fractionnements.

Un autre fait qui semble résulter de nos expériences, est l'augmentation progressive de la dilution des fractions pseudoglobuliniques. Cette augmentation est très nette et suggère que les fractions solubles qui naissent ont un poids moléculaire moyen de plus en plus faible.

Constitution des lipides contenus dans les différentes fractions protéïdiques.

Les fractions lipoprotéïdiques que l'on a pu obtenir jusqu'à présent à partir du sérum, contiennent toutes plusieurs genres de graisses. Même la fraction la mieux caractérisée, le complexe de MACHEBEUF, contient un mélange de lécithides et de cholestérides. La constitution de ces mélanges lipidiques montre d'ailleurs toujours des teneurs appréciables dans chacun des constituants. Ce fait est un argument sérieux contre l'existence de complexes lipoalbuminiques de nature chimique à proprement parler. L'euglobuline, la pseudoglobuline et l'albumine sont des mélanges, si cependant il y avait vraiment des complexes chimiques : lécithalbumines ou cholestéroalbumines, on aurait dû trouver des fractions où les lécithides ou les cholestérides seraient prédominants, les autres constituants lipidiques étant absents ou présents seulement comme impuretés à l'état de traces. Le fait que les fractions lipoprotéïdiques contiennent toujours des mélanges de phosphatides et d'autres lipides suggère plutôt une théorie physique dans l'explication de la nature de ces complexes.

Étude des propriétés physico-chimiques du système lipoprotéidique du sérum.

Stabilité de l'état caché des lipides du sérum.

La stabilité de la dispersion aqueuse des graisses du sérum est en général variable. Il faut considérer le problème de différentes façons.

En l'absence de réactifs les lipides du sérum normal paraissent conserver leur état hydrosoluble presque indéfiniment. Les sérums conservés stériles restent limpides très longtemps et même après des années il n'apparaît qu'un léger dépôt blanc. Le liquide surnageant garde sa limpidité et il n'y a pas trace de graisses collectées à la surface.

La stabilité vis-à-vis de *l'éther* de l'état caché des lipides du sérum est considérable. Par une extraction durant 24 heures on n'extraît que 1 à 2 o/o des graisses du sérum. L'action de l'extraction prolongée fut étudiée par M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL (1), nous avons déjà relaté ci-dessus leurs résultats (voir page 57) : par une extraction prolongée pendant 6 mois on n'arrive à extraire que 50 o/o à peu près des graisses du sérum.

Il est à noter que le système « sérum », doué d'une stabilité aussi extraordinaire, est quand même presque certainement un système en faux équilibre. Les lipides du sérum une fois « dénaturés » s'agrègent et se collectent en gouttelettes. La séparation des deux phases : une phase de graisses et une phase aqueuse est vraisemblablement l'expression du vrai équilibre physique du système. Tout au moins on doit supposer un faux équilibre jusqu'à preuve contraire (obtention d'un système protéides-lipides en dispersion aqueuse stable) qui n'a pas été fourni jusqu'à maintenant.

Les liaisons lipoprotéidiques qui n'ont aucune tendance à se rompre spontanément, ne paraissent pas stables vis-à-vis de certains réactifs. Le réactif destructeur par excellence paraît être une association alcool-éther. Nous avons déjà vu que l'alcool-éther à froid opère l'extraction de la majeure partie des lipides

(1) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 736 (1931).

sans modifier sensiblement les propriétés de solubilité des protéides. Il faut pour cela une désyhydratation par l'alcool à très basse température suivie d'une extraction étherée prolongée dans l'appareil de SOXHLET (méthode de HARDY). Pour opérer une extraction parfaitement quantitative des lipides il faut cependant employer des méthodes qui dénaturent les protéides. Il faut en particulier utiliser l'appareil de KUMAGAWA et opérer une extraction prolongée (8 à 9 heures) par l'alcool bouillant, suivie d'une extraction étherée à chaud (2 à 3 heures).

Les liaisons lipoprotéidiques du sérum présentent une résistance extrême à l'effet peptique. Nous avons étudié avec l'aide de B. DELAGE l'extraction étherée après l'action de la pepsine. Le sérum fut soumis à l'action de différents échantillons de pepsine à des concentrations variables en ions hydrogène. La digestion peptique fut prolongée pendant 3 jours. Toutes ces expériences donnèrent le même résultat : l'extraction étherée n'a subi aucune augmentation sous l'influence de la pepsine. Le comportement du sérum est ici foncièrement différent de celui d'autres tissus comme le tissu musculaire, pour lesquels la pepsine est capable d'opérer la lipophanérose. Remarquons que nos échantillons étaient des pepsines purifiées et que peut-être avec des sucs gastriques totaux les résultats sont différents. L'étude de cette question est à reprendre.

Résumé des faits et des conclusions exposés ci-dessus.

Tout ce qui précède montre que des rapports intimes réunissent lipides et protéides dans le sérum et nous autorise à admettre un système lipoprotéique. La plus grande partie des lipides du sérum est entraînée dans des précipitations réversibles avec les différentes fractions protéidiques et le partage des graisses se fait avec une régularité assez satisfaisante entre les grandes fractions protéidiques, globulines et albumines. Il ne s'agit certainement pas là d'un simple entraînement par un précipité colloïdal. Comment pourrait-on en effet expliquer en se basant sur cette supposition que les $2/3$ à peu près des graisses restent en solution après la précipitation des globulines. Les caractères physico-chimiques des lipides et des protéides subissent des

influences réciproques (solubilités, ionisation, etc.). On a donc certaines raisons de supposer que les liaisons qui unissent lipides et protéides dans les précipités, préexistaient déjà dans la solution.

Dans le premier chapitre de cet exposé nous avons vu que les protéides eux-mêmes sont constitués par des mélanges complexes, où des espèces chimiques plus simples (polypeptides) sont réunies par des forces de nature discutée. Dans le deuxième chapitre nous venons de voir que le problème des rapports entre protéides et protéides semble être tout à fait connexe de celui des rapports entre protéides et lipides, la question de la nature des complexes lipoprotéidiques trouve son intérêt exagéré de ce fait.

CHAPITRE IV

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA NATURE ET LA STABILITÉ DES LIAISONS ENTRE PROTÉIDES ET LIQUIDES DANS LE SÉRUM SANGUIN (1).

Nous allons exposer dans ce chapitre divers résultats expérimentaux obtenus en étudiant l'extraction du sérum par de l'éther à froid en présence d'alcool à des concentrations variables, mais toujours assez faibles pour ne pas dénaturer les protéides. Comme nous allons voir de nombreuses conclusions sur la nature des liaisons lipoprotéïdiques du sérum peuvent être tirées de cette étude.

Nous avons vu l'activité spéciale du mélange alcool-éther dans l'extraction des graisses du sérum (voir page 52). Dans la méthode de HARDY l'extraction presque quantitative des lipides s'effectue à froid si l'on épuise les protéides par de l'éther après les avoir déshydratés par de l'alcool absolu à très basse température. Nous avons cherché à étudier les modalités d'action de l'alcool et nous avons été amenés à faire l'étude physico-chimique approfondie de ce phénomène à la suite d'une observation curieuse : si l'on ajoute de l'alcool à du sérum surmonté d'une couche d'éther, la phase étherée se colore parfois très rapidement en jaune. La coloration jaune prouve une extraction du lipochrome et ce phénomène accompagne généralement l'extraction des graisses. Ce qui est frappant c'est que le sérum garde encore sa limpidité, les protéides ne sont donc pas profondé-

(1) Certains des faits exposés ici ont déjà été publiés en collaboration avec M. A. MACHEBŒUF. *C. R. Acad. Sciences*, **194**, 1102 (1932); *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **14**, 1168 (1932).

ment touchés. Cet ensemble de faits est très curieux : l'éther seul est incapable de produire l'extraction, mais en présence d'alcool il agit parfois avec une rapidité très grande.

Rien ne semble plus facile que de faire l'étude quantitative de ce phénomène en déterminant les quantités de graisses extraites en fonction de la concentration en alcool, en fonction du temps et d'autres facteurs. Certaines difficultés se rencontrent cependant ici comme dans la plupart des études physico-chimiques effectuées sur les milieux biologiques complexes. A côté de résultats d'allure absolument mathématique qui permettent la construction de courbes très régulières, on rencontre parfois des irrégularités. Ces discordances sont dues à la complexité extrême des milieux biologiques. Les cas individuels peuvent s'écarter beaucoup du type moyen. En biologie il faut multiplier les expériences pour pouvoir tirer une conclusion définitive. Nous reviendrons plus loin sur ces irrégularités, étudions tout d'abord ce qui se passe habituellement lorsque l'on met en présence du sérum, de l'éther et de petites quantités d'alcool.

Influence de la quantité d'alcool sur l'extraction des lipides sériques par l'éther en un temps donné.

Description de la méthode.

L'étude expérimentale fut conduite de la façon suivante : Nous avons mis dans une série d'entonnoirs à décantation un volume de sérum bien déterminé, auquel nous avons ajouté un égal volume d'éther et des quantités d'alcool à 96° progressivement croissantes. Nous avons activé l'établissement de l'équilibre entre la phase aqueuse (sérum) et la phase éthérée en agitant très modérément et dans des conditions toujours identiques chacun des entonnoirs. Pour éviter les formations d'émulsions et l'apparition d'autres phénomènes secondaires pouvant résulter d'une agitation brutale, nous avons renversé simplement lentement 12 fois de suite les entonnoirs. Dans ces conditions l'alcool pénétre progressivement la phase aqueuse et les processus de dénaturation irréversibles qui pourraient résulter d'une addition brutale d'alcool, sont évités.

La distribution de l'alcool entre la phase aqueuse et la phase éthérée (et éventuellement une phase émulsionnée (1) est complexe et se fait suivant des coefficients de partage assez mal connus, la majeure partie de l'alcool passe cependant dans la phase aqueuse. Sauf indications spéciales nous avons toujours pris des volumes égaux de sérum et d'éther et pour simplifier notre langage, nous avons exprimé la quantité d'alcool ajoutée en donnant le pourcentage d'alcool à 96° par rapport au volume de sérum. Ainsi lorsque pour 20 cc. de sérum (et 20 cc. d'éther) nous avons ajouté 2 cc. d'alcool à 96°, nous disons pour simplifier que la quantité d'alcool est 10 p. 100, en sous-entendant « du volume du sérum ». Comme les volumes réciproques du sérum et d'éther sont toujours les mêmes et que le coefficient de partage reste sensiblement constant, toutes les conditions sont bien déterminées et la dénomination arbitraire : « 10 p. 100 » signifie toujours la même chose, mais correspond à un titre en alcool de la phase aqueuse qui est en réalité nettement inférieur à 10°, car tout d'abord il s'agit d'alcool à 96° et non d'alcool absolu et d'autre part l'éther surnageant conserve une partie non négligeable de l'alcool.

Études qualitatives et choix des concentrations alcooliques convenables pour l'étude quantitative.

En présence d'éther l'aspect et la consistance du sérum se trouvent être fortement sous la dépendance de la concentration en alcool.

Pour les concentrations faibles en alcool le sérum reste bien fluide en présence d'éther. Jusqu'à 20 p. 100 il ne se forme d'habitude aucune émulsion, une surface de séparation bien nette existe entre les phases qui permet un travail quantitatif. Vers la concentration de 20 p. 100 un trouble net apparaît et vers 26 p. 100 la plus grande partie des protéides du sérum forme une émulsion qui se rassemble entre la phase aqueuse et la phase éthérée.

(1) SØRENSEN (*C. R. du laboratoire Carlsberg*, Vol. 18, N° V, 1930) a montré que la phase émulsionnée dans le cas du sérum et de l'éther sans alcool n'avait pas toujours la même constitution que la phase aqueuse sous-jacente.

Pour ces concentrations relativement élevées en alcool la viscosité du sérum augmente d'ailleurs progressivement avec le temps pour aboutir en une demi-heure environ à une prise en masse globale, le sérum forme alors un gel compact. La gélification complète se produit vers 30 p. 100.

Ces essais furent effectués sur du sérum de Cheval, mais nous avons vérifié que, du point de vue qualitatif tout au moins, les phénomènes restent les mêmes pour les sérums d'Homme, de Mouton et de Lapin.

L'étude quantitative n'est possible que pour les concentrations alcooliques ne dépassant pas 20 p. 100 du volume de sérum ; au-dessus de cette concentration la séparation quantitative de la phase étherée devient impossible. Notre étude ne s'est donc pas étendue au-delà de cette limite de teneur en alcool.

Séparation des phases et détermination de la quantité de graisses extraites.

Après un temps de contact bien déterminé entre l'éther et le sérum alcoolisé on soutire la phase aqueuse. Avec un peu de précaution la séparation des phases a pu généralement être effectuée d'une façon absolument quantitative. C'est seulement lorsque la concentration en alcool atteint 18 à 20 p. 100 que des traces d'émulsion ou de protéides dénaturés rassemblés à la surface de séparation, ont gêné cette séparation. Après la séparation la phase étherée est lavée à l'eau pour enlever l'alcool et les substances non lipidiques qui auraient pu être entraînées mécaniquement. Les phases étherées ainsi lavées sont ensuite mises dans des fioles de FOURNEAU tarées, puis évaporées à sec. Les résidus, sont enfin pesés après dessiccation jusqu'au poids constant dans le vide sulfurique.

Résultats obtenus.

Un résultat essentiel découle de l'étude de l'extraction étherée en fonction de la concentration en alcool : Les graisses extraites, souvent en quantité considérable, varient quand la teneur

en alcool change. *La quantité des graisses extraites est une fonction discontinue de la concentration en alcool, elle atteint sans transition un maximum brusque pour une certaine concentration en alcool.*

Voici par exemple une série de chiffres obtenus en opérant sur 25 cc. de sérum de Cheval et 25 cc. d'éther en présence de quantités variables d'alcool à 96° :

TABLEAU VIII

Quantité d'alcool à 96° o/o de sérum	0	2	4	6	8	10	12	14	20
Mgr. de graisses extrai- tes	1,5	1,6	2,7	3,2	75	74	75	25	42

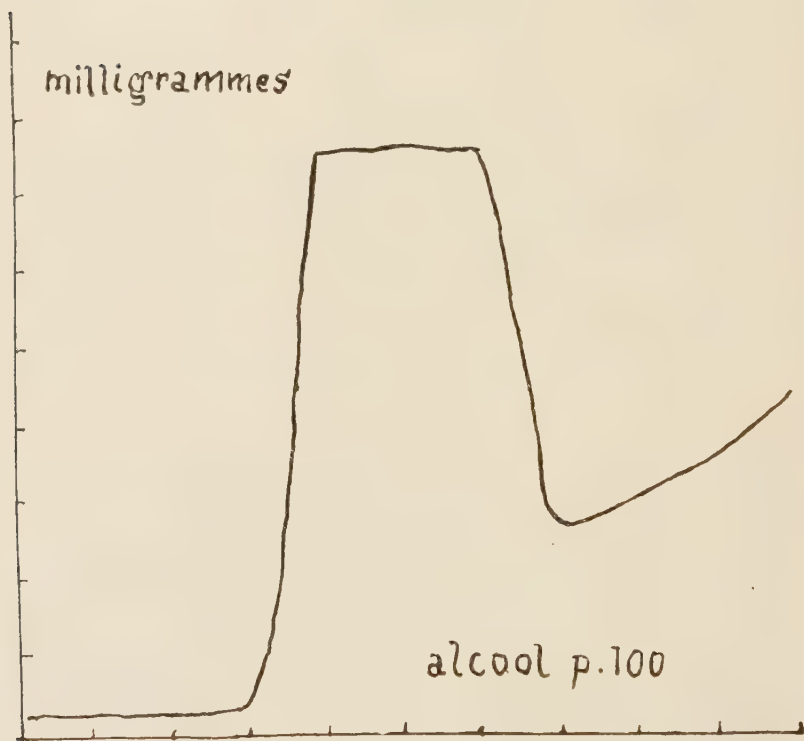
^a Le temps de contact entre le sérum et l'éther fut 6 heures. Les 25 cm³ de sérum utilisés ici contenaient 156 mgr. de lipides totaux.

Comme on le voit, il y a une région d'extraction optimale pour laquelle, entre des limites assez étendues, la quantité de graisses extraites est indépendante de la quantité d'alcool ajoutée. Cette région optimale est séparée par deux discontinuités brusques des concentrations immédiatement supérieures et inférieures. Lorsque la quantité d'alcool passe de 0 à 6 p. 100, la quantité de lipides extraite n'augmente pas beaucoup (elle passe de 1,5 à 3,2 mgr.). Lorsque la quantité d'alcool passe par contre de 6 à 8 p. 100, la quantité de lipides extraite passe brusquement de 3,2 à 75 mgr. Entre 8 et 12 p. 100 d'alcool la quantité extraite reste stationnaire, pour tomber ensuite brusquement de 75 à 25 mgr., lorsque la quantité d'alcool passe de 12 à 14 p. 100.

La première discontinuité est absolument caractéristique, on la retrouve pour tous les sérums de Cheval ou d'autres mammifères que nous avons étudié : *Il y a toujours un seuil de concentration alcoolique au-dessous duquel l'extraction ne se produit plus.*

L'inversion de la courbe, c'est-à-dire le point où la quantité

extraite diminue lorsque la concentration augmente, n'est pas absolument constante ; tout au moins ne se produit-elle pas pour tous les sérums au-dessous de 20 p. 100. Nous l'avons trouvé pour quelques sérums de Cheval et de Lapins, par contre



COURBE n° I

représentative des variations de la quantité de graisses extraite d'un sérum de Cheval en fonction de la quantité d'alcool ajoutée.

elle ne paraît pas exister pour le sérum humain et le sérum de Mouton et elle n'est pas absolument constante pour le sérum de Cheval.

*L'extraction en fonction de la quantité d'alcool pour le sérum
d'autres espèces que le Cheval.*

Nous reproduisons ci-dessous les trois séries de chiffres obtenus avec un sérum humain, un sérum de Lapin et un sérum de Mouton. Chacun de ces chiffres était déterminé sur 5 cc. de sérum seulement, ce qui diminue beaucoup la précision des mesures et la régularité des courbes.

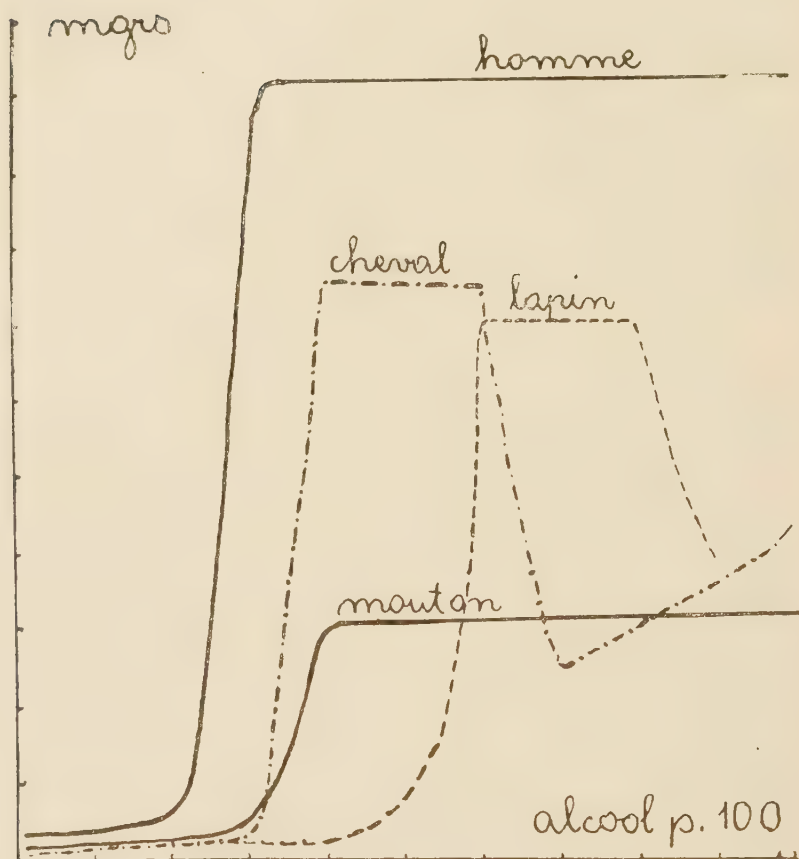
TABLEAU IX

Concentration en alcool (1)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Homme. . . .	0,8	1,1	19	21	21		20			
Lapin	0,6	0,7	0,5	1,3	1,3	15	14	14	7,8	
Mouton. . . .	0,3	1,8	1,5	8,2	7,3		7,3		7,3	

(1) Au sujet des chiffres qui expriment les concentrations en alcool, nous rappelons ce qui a été dit page 110.

Comme on le voit les courbes sont différentes pour les différentes espèces. Le seuil de la zone d'extraction optimale est différent : 6 p. 100 chez l'Homme, 8 p. 100 chez le Cheval et le Mouton, 12 p. 100 chez le Lapin. L'inversion n'existe pas chez le Mouton et l'Homme, elle est produite à 14 p. 100 dans le cas du sérum de Cheval et à 18 p. 100 dans celui de Lapin.

Ces différences entre les espèces zoologiques ne sont cependant pas absolues, parce que les courbes d'extraction en fonction de la concentration en alcool ne sont pas absolument constantes pour une même espèce. En dehors des cas atypiques en effet (précipités ou émulsions), il y a des variations dans les conditions physiologiques et même des variations purement individuelles. Le seuil d'extraction peut être déplacé et la valeur absolue des quantités extraites à l'optimum peut fortement varier.



COURBE n° II

représentative des variations de la quantité de graisses extraite des sérums d'Homme et de différentes espèces animales (Cheval, Mouton, Lapin) en fonction de la quantité d'alcool ajoutée.

Variations pour les sérums d'une même espèce.

On a trouvé pour un sérum de Cheval normal un seuil d'extraction à 10 p. 100. Les quantités totales extraites pour les différents Chevaux dans les conditions optimales ont varié de 20 à 100 mgr. pour 25 cc. de sérum.

Proportion des lipides totaux extraits.

Comme on le voit, la proportion des lipides totaux extraits du sérum par l'éther peut être considérable. Les chiffres sont parfois plus faibles ou plus élevés, mais le plus souvent on extrait 50 o/o environ des lipides totaux du sérum. Cette proportion a même une fixité remarquable pour les différentes espèces :

TABLEAU X

	Cheval I	Cheval II	Homme II	Mouton I
Lipides totaux	6,4	7,1	8,1	3,2
Lipides extraits	3,0	3,25	4,2	1,6
Rapports lipides extraits sur lipides totaux . .	47 o/o	46 o/o	52 o/o	50 o/o
Les chiffres sont exprimés en grammes par litre de sérum.				

Pour certains sérums l'extraction se fait bien mieux que pour d'autres. Nous avons par exemple extrait d'un sérum de cheval 80 o/o des lipides totaux en 5 heures d'extraction. Pour quelques rares sérums on extrait à peine 4 o/o des lipides totaux. Même pour ces sérums on observe cependant le saut brusque dans la quantité extraite lorsque l'on dépasse le seuil d'extraction.

Cheval en digestion.

Chez le cheval en digestion nous avons retrouvé l'essentiel du phénomène (*). Nous rapportons ci-dessous les chiffres obtenus sur le sérum d'un cheval en pleine digestion (prise de sang effectuée 4 après le repas) :

(*) Nous avons toujours effectué la prise de sang chez le cheval dans la veine jugulaire, cette conclusion ne peut donc pas être généralisée au sang veineux porte par exemple que nous n'avons pas étudié.

TABLEAU XI

Quantités d'alcool . .	0	2	6	8	10	12	14	20
Mgr. de graisses extraits	0	0	0	24	20	25	26	26
Les chiffres se rapportent à 10 cm ³ de sérum. La durée d'extraction était de 5 heures. Dans les conditions optimales 43 o/o des graisses totales du sérum ont été extraits.								

Cette courbe ne présente pas d'inversion, les faits essentiels persistent cependant : *Inextractibilité ici très complète par l'éther en absence d'alcool et extraction brusque et abondante à partir d'un seuil de concentration en alcool.*

Nature des graisses extraites.

En ce qui concerne la nature des graisses extraites, nous retrouvons un fait que nous avons déjà remarqué dans l'étude des lipides qui précipitent avec les diverses fractions protéïdiques (voir page 74) : *on n'extrait pas exclusivement ou d'une façon prédominante une certaine espèce de lipides, mais un ensemble complexe de graisses qui a sensiblement la même constitution que les graisses totales du sérum.* Ce fait est illustré par le tableau ci-dessous :

TABLEAU XII

Graisses extraites lorsque la concentration en alcool est à l'optimum.

	P. lipidique	Insaponifiables totaux	Acides gras totaux
Lipides totaux du sérum . . .	1 0/0	24 0/0	59 0/0
Lipides extraits.	0,9 »	32 »	60 »
Les chiffres se rapportent à un sérum de Cheval extrait dans les conditions habituelles pendant 5 heures. Le dosage du phosphore fut effectué suivant la méthode de M. A. MACHEBŒUF (1), la saponification et la détermination de l'insaponifiable total et des acides gras suivant les indications de LEMELAND (2).			
(1) M. A. MACHEBŒUF : <i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 8, 464 (1926).			
(2) LEMELAND : <i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 4, 300 (1922) et 5, 110 (1923).			

Au sujet de la *nature des graisses extraites aux différentes concentrations en alcool* nous pouvons encore observer des faits intéressants.

La constitution de ces graisses reste sensiblement constante pour la région optimale. Les graisses extraites aux concentrations situées au-dessous du seuil d'extraction, vu leur faible quantité, n'ont pas pu être analysées. Lorsqu'il existe une limite supérieure à la zone optimale, les graisses extraites à la concentration immédiatement supérieure en alcool ont une constitution très différente de celle des lipides extraits à l'optimum, car l'extraction des lécithides ne se produit pratiquement plus dans ces conditions :

TABLEAU XIII

Quantités d'alcool . .	6	8	10	12	14	16	18	20
Sérum de Cheval n° 2								
P. lipidique o/o . . .		0,9	0,8		0,2			0,9
Insaponifiable o/o . .		32	31					
Acides gras o/o . . .		59	60					
Mgr. extraits	1,3	30	30	30	10			17
Sérum de Lapin								
P. lipidique o/o . . .						0,7	indosable	
Quantités extraites . .				30	28	28	15	
Sérum humain								
P. lipidique o/o . . .	0,4	0,4	0,6		0,4			
Mgr. extraits	19	21	21		20			
Les chiffres se rapportent sur 10 cm ³ de sérum. Les teneurs sont exprimées o/o des lipides totaux.								

Comme le montrent ces chiffres, lorsque l'extraction diminue pour une certaine concentration alcoolique relativement élevée, le phosphore lipidique tombe fortement (de 9 o/oo à 2 o/oo pour le sérum de Cheval et de 7 o/oo à une quantité indosable pour le sérum de Lapin (*)).

(*) Comme d'autre part la quantité de lipides extraits diminue en même temps, la quantité de P extraite au minimum est très faible.

Existe-t-il un coefficient de partage entre le sérum et l'éther.

Le problème que nous posons nécessite une explication préliminaire. Il pourrait paraître en effet absurde de supposer un coefficient de partage entre une phase aqueuse (sérum) et l'éther pour des graisses comme celles qui constituent les lipides sériques (cholestérols, lécithides et glycérides). Le sérum n'est cependant certainement pas comparable à une phase aqueuse simple, il contient une très grande quantité de protéides. Ces corps excessivement complexes, de poids moléculaire très élevé pourraient constituer une troisième phase. *A priori* d'ailleurs il ne serait pas absurde de supposer un coefficient de partage pour les graisses du sérum entre une phase protéidique et une phase étherée et d'expliquer l'état physique des lipides du sérum par une sorte de dissolution de ces lipides dans les protéides sériques.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons examiné si l'extraction unique que nous avons effectuée aboutit d'emblée à la limite des lipides extractibles ou si elle est limitée par un simple coefficient de partage. Pour ce faire nous avons étudié les variations de la quantité de lipides extraits en présence d'une même quantité d'alcool en fonction du volume d'éther utilisé pour l'extraction. Les résultats prouvent sans contestation qu'il n'y a pas de coefficient de partage pour les lipides entre le sérum alcoolisé et l'éther : *l'extraction aboutit en une seule fois à sa limite.*

Les expériences furent conduites de deux façons différentes :

Description des expériences : 1° Influence du volume d'éther sur la quantité de graisses extraites.

Dans cette étude il y avait un facteur inconnu : le coefficient de partage de l'alcool entre le sérum et la phase étherée. Lorsqu'on augmente le volume d'éther en laissant constantes les quantités d'alcool et de sérum, la phase sérique s'appauvrit progressivement en alcool. Cependant, comme nous l'avons vu, il y a une région assez étendue des concentrations alcooliques où la

quantité de graisses extraites reste constante. Comme le coefficient de partage doit être fortement en faveur de la phase aqueuse, si l'on part d'une concentration assez élevée dans la région optimale de l'extraction, pour des volumes d'éther assez différents, la concentration en alcool, tout en diminuant dans la phase aqueuse, doit rester dans les limites de la zone optimale. Si on observe dans ces conditions une augmentation de la quantité extraite, ce fait ne peut être attribué qu'à l'existence d'un coefficient de partage entre l'éther et le sérum pour les graisses.

Nous avons donc ajouté à un même volume de sérum des quantités variables d'éther et toujours la même quantité d'alcool. Nous avons pris dans nos expériences la concentration alcoolique de 10 p. 100 par rapport au sérum, ce qui permet de descendre notablement dans l'échelle des concentrations avant que la chute de la teneur en alcool amène au-dessous de l'optimum et influence l'extraction. Les chiffres rapportés ci-dessous sont très concluants :

TABLEAU XIV

Quantités d'alcool	10 o/o	10 o/o	10 o/o	10 o/o
Volume d'éther	10 cm ³	20 cm ³	35 cm ³	60 cm ³
Mgr. de graisses	63	61	62	4
Chaque point fut déterminé sur 20 cm ³ d'un même sérum de Cheval, auxquels on a donc ajouté 2 cm ³ d'alcool à 96°.				

Lorsque les volumes d'éther ont varié de 10 à 35 cc., les quantités de graisses extraites sont restées constantes — il n'y a donc pas de coefficient de partage. Lorsque le volume d'éther atteint 60 cc., un phénomène secondaire se produit. La concentration alcoolique dans le sérum tombe au-dessous de la limite inférieure de la zone optimale et l'extraction ne se produit plus.

2° Influence de la répétition des extractions.

Si l'on opère plusieurs extractions successives par de l'éther, l'éther extrait l'alcool de la phase sérique et la concentration alcoolique tend à diminuer progressivement par les extractions successives. On a remédié à cette cause d'erreur en utilisant de l'éther préalablement chargé d'alcool et d'eau par agitation avec une phase aqueuse contenant de l'alcool à la même concentration que le sérum étudié. La première extraction fut opérée par de l'éther anhydre, les autres par de l'éther chargé d'alcool et d'eau dans les conditions précitées. Les résultats ci-dessous sont aussi concluants que les précédents :

TABLEAU XV

Nombre des extractions . . .	1	2	3	4
Mgr. de graisses extraites . .	68,5	2,9	2	0,8
Les chiffres se rapportent à 30 cm ³ de sérum de Cheval que l'on a extrait à 4 reprises par 30 cm ³ d'éther. Chaque extraction a duré 24 heures ; la quantité d'alcool à 96° correspondait à 10 o/o du volume de sérum, soit 3 cm ³ .				

La presque totalité des substances qui doivent être extraites, est extraite à la première extraction. Les petites quantités de substances extraites pendant le deuxième et le troisième épuisements semblent être constituées surtout par un pigment et non par des graisses. Ce pigment semble d'ailleurs être la seule substance présentant un coefficient de partage entre l'éther et l'eau, car il repasse en partie dans l'eau qui sert à laver les phases éthérées après décantation.

Les résultats de toutes ces expériences prouvent qu'il n'y a pas de coefficient de partage entre le sérum et l'éther pour les graisses extraites en présence d'alcool à de faibles concentrations.

**Changements de viscosité et d'aspect du sérum
pendant l'extraction.**

*Étude des opalescences et des précipités qui se produisent
aux diverses concentrations en alcool.*

Des phénomènes d'opalescence très caractéristiques se produisent pendant l'extraction étherée pour certaines concentrations en alcool. Ces opalescences sont en rapport direct avec l'extraction et sont les signes précurseurs de la lipophanérose. Les phénomènes d'opalescence sont soumis à des variations individuelles, examinons d'abord le cas le plus général.

Les changements d'aspect que subissent les sérums dépendent de la concentration de l'alcool, ils dépendent aussi dans une très large mesure du temps écoulé depuis le début de l'expérience. Examinons tout d'abord l'aspect que présentent les phases sériques une heure environ après qu'elles ont été séparées de l'éther qui était resté à leur contact pendant 5 heures.

Du point de vue de l'aspect des phases sériques quatre régions différentes peuvent être distinguées dans l'échelle des concentrations alcooliques. Ces régions sont exactement superposables aux régions d'extractibilité différente. Le tableau n° XVI et la photographie n° 1 rendent bien compte du phénomène :

TABLEAU XVI

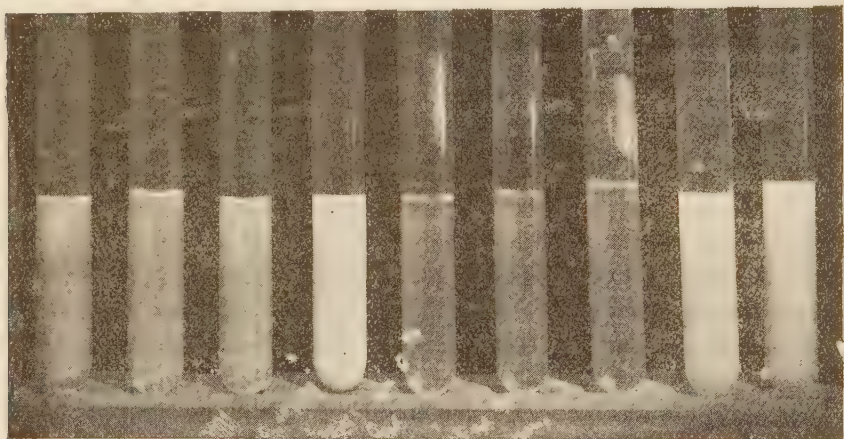
*Aspect des phases sériques une heure après la séparation
des phases étherées.*

Concentrations en alcool.	0	2	6	8	10	12	14	20
Quantités extraites . .	1,5	1,6	2,7	74	75	74	25	42
Aspect	limp	± limp	opal	limp	limp	limp	± opal	opal

Pour les quantités d'alcool faibles, au-dessous de 6 p. 100, le sérum garde à peu près sa limpidité ; c'est la région où l'extraction ne se produit pas encore. A la concentration qui précède

immédiatement celle qui correspond au seuil d'extraction (6 p. 100), le sérum devient rapidement opalescent après la séparation de l'éther surnageant. Cette opalescence se manifeste seulement après la séparation de la phase étherée et augmente progressivement en intensité au fur et à mesure que s'évapore l'éther dissous dans la phase hydro-alcoolique.

Pour les concentrations plus élevées, qui correspondent à la région optimale d'extraction étherée (8, 10 et 12 p. 100), le sérum garde une limpidité parfaite. Pour ces concentrations la limpidité dépasse souvent même la limpidité propre du sérum primitif.



Pour 14 et 20 p. 100 d'alcool enfin on a de nouveau une région d'opalescence. Pour ces fortes concentrations en alcool l'opalescence existe déjà avant la séparation des phases ; après cette séparation il se forme d'ailleurs des précipités de protéides.

Notons en outre que le point d'opalescence critique n'est pas tout à fait constant pour une même espèce animale, mais il est toujours en relation étroite avec le seuil de l'optimum d'extraction des lipides.

D'autres troubles et précipités peuvent apparaître plus tard, longtemps après la séparation des phases. Dans certains cas par exemple l'opalescence critique se résout lentement en gouttelettes de graisses qui montent à la surface. Lorsque le rassemblement de ces gouttelettes est terminé, le sérum sous-jacent est lim-

pide. Ce fait se produit régulièrement dans le cas du sérum humain.

Si l'on extrait un sérum humain normal pendant 5 heures, l'extraction ne se produit pas encore à 6 p. 100 d'alcool et le sérum pour cette concentration présente une opalescence assez marquée. Après la séparation des phases cette opalescence est remplacée en une heure environ par des gouttelettes d'émulsion qui montent lentement à la surface (*).

Le sérum de Lapin donne des aspects foncièrement différents. Ce sérum présente une forte opalescence à toutes les concentrations alcooliques, sauf à une seule correspondant au premier point d'extraction optimale. A cette concentration la limpidité dépasse celle du sérum primitif.

Etude de la viscosité du sérum extrait par l'alcool et l'éther.

Cette étude donne des renseignements sur les modifications que subissent les protéides du sérum pendant l'extraction alcool-étherée. Nous savons en effet que lorsque l'aggrégation d'un colloïde hydrophile augmente, la viscosité du système subit une augmentation parallèle. L'augmentation de la viscosité du sérum sera donc connexe à un début de dénaturation des protéides sériques.

Avant de commencer cette étude faisons quelques remarques. Au-dessus de la concentration de 12 p. 100, comme nous l'avons vu, les protéides précipitent à la longue en partie. En l'absence d'éther cependant cette précipitation ne se produit pas. L'alcool seul, sans éther et jusqu'à 20 p. 100 inclusivement, ne change nullement la limpidité du sérum, il ne provoque aucune précipitation de protéides, ni aucune mise en liberté de graisses (lipophanérose). Ce n'est que très lentement, au bout de 7 à 8 jours à peu près, que le sérum alcoolisé commence à présenter une très légère opalescence. Le changement profond que subit le

(*) Pour le sérum humain, comme pour le sérum de Cheval, les phénomènes d'opalescence sont assez souvent irréguliers ; des précipités ou des émulsions apparaissent parfois à n'importe quelle concentration. Ces phénomènes irréguliers coïncident souvent avec l'inextractibilité des lipides.

système lipoprotéidique par l'association alcool-éthérée dans nos expériences, ne doit donc pas changer profondément la constitution des protéides.

La courbe représentative de la viscosité en fonction de la concentration alcoolique atteste un début de dénaturation à partir de 14 p. 100 (1). Nous rapportons ci-dessous les résultats d'une de nos expériences :

TABLEAU XVII

Concentrations en alcool . . .	0	4	6	8	12	20
Viscosités	15	15	17	17	20,5	29

Les viscosités des phases hydroalcooliques furent déterminées par la méthode d'écoulement pour un sérum extrait pendant 5 heures. Les chiffres sont exprimés en unités arbitraires (durées d'écoulement).

Nous constatons qu'une variation très peu importante d'ailleurs, se manifeste au point d'opalescence critique (6 p. 100). La viscosité n'atteint une valeur relativement élevée que pour les fortes teneurs en alcool.

Etude du rapport albumine sur globuline avant et après l'extraction alcool-éthérée.

Cette étude est un complément de celle que nous avons exposée dans le chapitre précédent : Par ces études nous cherchions à savoir si les protéides subissent des modifications profondes pendant l'extraction alcool-éthérée. Cette étude permet également de répondre à une autre question : Les graisses contenues dans les grandes fractions protéidiques interviennent-elles dans la définition de l'albumine et de la globuline ? La réponse est donnée par nos expériences :

(1) La viscosité aurait pu changer aussi par la formation d'émulsions. Ce n'était pas le cas dans nos expériences où nous avons chassé l'éther par un courant d'air avant de faire les déterminations de viscosité.

Le rapport quantitatif albumine/globuline n'est nullement changé par l'extraction dans les conditions optimales.

TABLEAU XVIII

Sérum de Cheval n° 2.

	Avant l'extraction	Après l'extraction
Globulines	399	401
Albumines	269	270
Albumines/globulines.	0,67	0,67

Les chiffres sont exprimés en milligrammes pour 10 cm³ de sérum. L'extraction fut effectuée en présence de 10 o/o d'alcool pendant 5 heures. Pour le dosage des fractions protéïdiques après l'extraction on a laissé l'éther dissout s'évaporer de la phase hydroalcoolique, mais on n'a pas éliminé l'alcool.

Le fait que l'on précipite dans les mêmes conditions avant et après l'extraction les mêmes quantités de protéïdes, prouve que les lipides que l'on a extraits n'interviennent pas dans leurs propriétés de solubilité. Les grandes fractions des protéïdes du sérum paraissent correspondre dans le sérum primitif à des complexes stables qui conservent leur constitution en présence d'alcool à g p. 100 environ même après l'extraction éthérée (1).

Dans une autre partie de notre exposé (voir p. 73) nous avons apporté certains faits qui semblaient prouver que les lipides pourraient intervenir dans les propriétés de solubilité des produits de fractionnement des globulines et des albumines. Ces résultats discordants prouvent simplement qu'il y a un équilibre physique particulier dans le sérum, qui naît du sang coagulé. Les graisses se trouveraient bien dissimulées dans le complexe lipoprotéïdique du sérum primitif, elles ne modifient en particulier nullement les propriétés de solubilité de ce complexe lipo-

(1) Récemment B. OHLSON et O. RUNDQVIST (*Biochemische Ztschr.*, 247, 249 (1932)) trouvent que le rapport globuline sur albumine ne change pas dans le sérum délipidé par l'alcool et l'éther à froid. Ce résultat est bien conforme au nôtre.

protéidique. Dans les fractions secondaires (complexe de MACHE-BŒUF ou fraction terminale des euglobulines) elles se révèlent par contre en modifiant plus ou moins les propriétés de solubilité des fractions où elles se concentrent.

Comment les graisses extraites dans les conditions optimales sont réparties dans les complexes lipoprotéidiques : albumine et globuline du sérum primitif.

Nous avons déjà exposé les phénomènes de coprécipitation qui nous ont permis de définir l'albumine et la globuline du sérum comme deux systèmes lipoprotéidiques ayant des teneurs en graisses bien déterminées (voir p. 61 et suivantes). Nous avons étudié sur le sérum de Cheval la teneur en graisses des albumines et des globulines avant et après l'extraction dans les conditions optimales. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus :

TABLEAU XIX

Sérum de Cheval n° 2 extrait en présence de 10 p. 100 d'alcool pendant 5 heures.

	Avant l'extraction	Après l'extraction	Quantités extraites par rapport aux quantités totales
Lipides totaux du sérum	64,5	34,5	47 o/o
Lipides entraînés par les albumines.	37,5	23	39 »
Lipides entraînés par les globulines.	22,5	7,3	67 »
Les chiffres sont exprimés en milligrammes pour 10 cm ³ de sérum.			

Comme nous le voyons les lipides des albumines comme ceux qui précipitent avec les globulines subissent l'extraction ; ceux des globulines s'extraitent cependant plus que ceux des albu-

mines. Si nous rapprochons ces résultats de ceux que nous avons obtenus en étudiant la nature des graisses extraites (voir page 86) il apparaît un fait bien certain : *Il ne s'agit dans notre extraction certainement pas d'un phénomène spécifique n'intéressant qu'une fraction bien déterminée des lipides du sérum.*

On extrait un ensemble lipidique complexe ayant à peu près la même constitution que les lipides totaux du sérum et qui était primitivement fixé à la fois aux albumines et aux globulines. Cette extraction est suivant les cas plus ou moins considérable, mais elle peut intéresser pour certains sérums jusqu'à 80 p. 100 des lipides totaux.

Extraction du complexe de Machebœuf.

Le complexe de MACHEBŒUF préalablement isolé du sérum puis soumis directement à l'extraction alcoolo-étherée dans les conditions de nos expériences ne livre pas ses lipides à l'éther. Cependant le sérum de Cheval qui a subi l'extraction alcoolo-étherée a perdu la propriété de fournir ce complexe dans les conditions habituelles.

Description de l'expérience.

Nous avons fractionné un sérum de Cheval suivant les indications de M. A. MACHEBŒUF (1). Nous avons dissous une certaine quantité du complexe et neutralisé la solution pour la soumettre ensuite à une extraction alcoolo-étherée à 10 p. 100 d'alcool pendant 24 heures. On n'a extrait dans ces conditions qu'un milligramme de graisses sur les 100 milligrammes à peu près qui se trouvaient dans la solution. Cette quantité infime devait se trouver sous forme d'impuretés.

Nous avons soumis un autre échantillon du même sérum à l'extraction étherée en présence d'alcool à 10 p. 100 pendant

(1) M. A. MACHEBŒUF, *Thèse Doctorat ès Sciences*, 1928.

24 heures. Après la séparation des phases nous avons dialysé le sérum sous pression contre une solution de sérum physiologique pour éliminer l'alcool et l'éther. Nous avons neutralisé et fractionné pour obtenir le complexe de MACHEBŒUF. Les albumines furent précipitées en présence d'un excès de sulfate d'ammonium à pH 3,8 ; elles se sont précipitées dans ces conditions comme d'habitude d'une façon bien quantitative, mais la dissolution du précipité dans l'eau distillée fut intégrale — ces albumines ne contenaient donc plus le complexe de MACHEBŒUF ou ce complexe avait été modifié par l'influence combinée de l'alcool et de l'éther.

Extraction des pigments.

La couleur jaune caractéristique du sérum est due à la présence d'un mélange de pigments qui, vu sa solubilité dans les graisses, a reçu le nom de lipochrome. Ce sont principalement des pigments du groupe du carotène.

Le plus souvent l'extraction des graisses et l'extraction des pigments vont parallèlement, le phénomène n'est cependant pas toujours aussi simple. Certains sérums de Cheval contiennent des pigments anormaux, vraisemblablement d'origine biliaire qui s'extraient partiellement par l'éther pur et qui ont un coefficient de partage entre l'éther et l'eau. Certains sérums très pigmentés laissent extraire beaucoup de pigments dans les conditions optimales, mais seulement des traces de graisses.

Les phénomènes sont dans leur ensemble très complexes et les pigments semblent intervenir pour leur part dans la constitution et la stabilité des complexes lipoprotéidiques. En particulier le sérum des animaux pendant l'été semble s'extraire plus mal et d'une façon différente de celui des animaux pendant l'hiver. Cette extraction inégale est vraisemblablement due à la nutrition qui est plus riche en pigments caroténoïdes pendant l'été (herbe fraîche).

Influence de la durée de contact entre l'éther et le sérum alcoolisé ; évolution de l'extraction en fonction du temps.

Description de la méthode.

Cette étude fut effectuée en mettant dans une série d'entonnoirs à décantation des quantités toujours les mêmes de sérum, d'éther et d'alcool, puis en effectuant la décantation après des contacts plus ou moins prolongés.

De nombreuses précautions ont été prises pour avoir des conditions rigoureusement comparables. Pour ce qui est de la température on n'a cependant pas pris de précautions spéciales, tous les entonnoirs à décantation étaient simplement maintenus à la température du laboratoire.

Comme nous supposions travailler dans un système hétérogène, toute notre attention s'est portée sur le mélange des systèmes dans des conditions comparables. Les boules étaient agitées à des intervalles de temps régulier et toutes de la même façon.

Résultats obtenus.

Les phénomènes sont différents pour les concentrations en alcool relativement faibles (jusqu'à 14 p. 100) et pour des concentrations plus fortes. Étudions d'abord les faits pour les concentrations relativement peu élevées en alcool, jusqu'à 10 p. 100 du volume de sérum inclusivement.

Extraction en fonction du temps pour les concentrations relativement faibles en alcool.

Les phénomènes observés avec les différents sérums de Chevaux ne sont pas tout à fait identiques, ils restent cependant toujours comparables. On peut résumer l'essentiel des faits de la façon suivante :

Pendant une phase préparatoire assez longue la quantité de

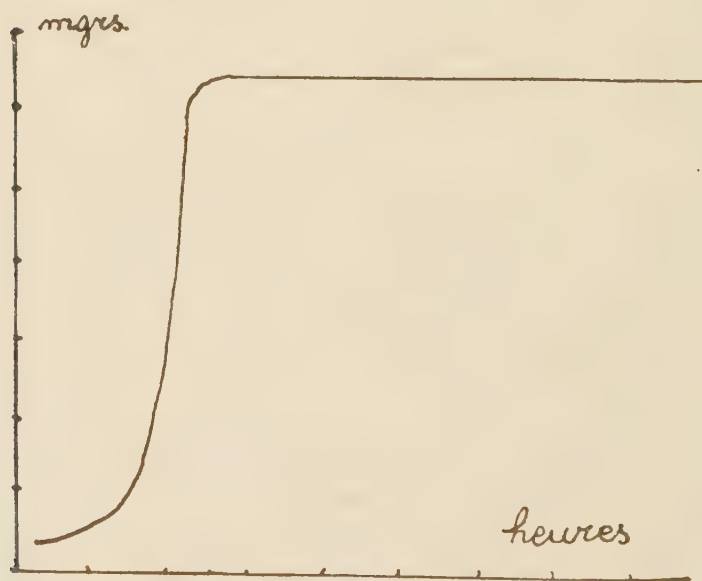
lipides extraits reste très faible et augmente avec une lenteur extrême: l'extraction s'opère ensuite brusquement et atteint sa limite avec une rapidité surprenante.

TABLEAU XX

Sérum de Cheval n° 3. Extraction éthérée en présence d'alcool à 10 p. 100. Chaque point fut déterminé sur 20 cm³ de sérum. Les entonnoirs furent agités toutes les dix minutes pendant les 7 premières heures.

Lipides extraits en fonction de la durée de contact de l'éther et du sérum alcoolisé.

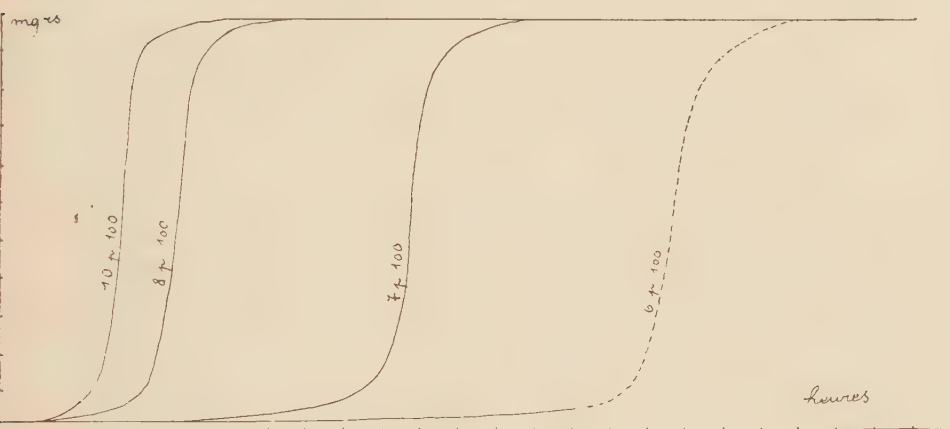
Durée de contact entre l'éther et le sérum	15 min.	30 min.	45 min.	1 h. 8	1 h. 30	2 h.	3 h.	48 h.
Mgr. de graisses extraites . . .	3,6	4,2	4,7	17,5	64,5	65	64	66



COURBE n° III

représentative des variations de la quantité de graisses extraites d'un sérum de Cheval en présence de 10 p. 100 d'alcool du volume de sérum en fonction de la durée de contact entre l'éther et le sérum.

Dans cette expérience ce n'est qu'après une heure que débute la phase active de l'extraction ; pendant la phase préparatoire, qui dure une heure environ, l'éther n'a extrait que 4,7 mgr. de lipides tandis que dans les 30 minutes qui suivent, l'éther dans les mêmes conditions extrait 60 mgr. de lipides. Le fait est curieux, en 30 minutes, toutes les conditions étant restées les mêmes, l'éther extrait 13 fois plus de lipides qu'il n'avait pu en extraire dans l'heure précédente. Bien plus, si l'on pro-



COURBE n° IV

représentative des variations de la quantité de graisses extraites d'un sérum de Cheval, en présence de quantités variables d'alcool (6, 7, 8 et 10 p. 100 d'alcool du volume de sérum) en fonction de la durée de contact entre l'éther et le sérum (voir tableau XXI).

longe le contact pendant 48 heures encore, l'éther n'extrait plus rien, tout ce qui devait être extrait l'a été pendant les 30 minutes qui ont suivi la phase préparatoire.

La durée de la phase préparatoire varie très notablement d'un Cheval à l'autre, nous avons eu entre nos mains un sérum (voir tableau XXI) pour lequel en présence de 10 p. 100 d'alcool, la phase préparatoire atteignait 7 heures : Pendant 6 heures l'éther n'extrait que des traces de lipides (moins de 2 mgr.) puis dans l'heure qui suit l'éther extrait dans les mêmes conditions plus de 39 mgr., soit 20 fois plus de lipides.

Nous avons répété cette série d'expériences en faisant varier

la quantité d'alcool ajoutée au sérum et nous avons constaté que la durée de la phase préparatoire varie dans de très larges limites lorsque varie la concentration de l'alcool. Dans le tableau n° XXI sont rapportés les chiffres obtenus au cours de l'une de ces expériences.

TABLEAU XXI

Sérum de Cheval n° 4. Extraction étherée en présence d'alcool à 6, 7, 8 et 10 p. 100. Chaque point fut déterminé sur 20 cm³ de sérum. Les chiffres sont exprimés en milligrammes de graisses pour 20 cm³ de sérum. Les entonnoirs n'étaient agités qu'au moment de l'établissement des mélanges et 15 minutes avant la séparation des phases.

*Influence de la teneur en alcool sur la durée
de la phase préparatoire.*

Concentrations en alcool :		6 o/o	7 o/o	8 o/o	10 o/o
Durée de contact entre l'éther et le sérum alcoolisé.	1 h. 30		0,9	1,1	1,2
	2 h.			1,1	
	3 h.			1,4	
	7 h.			3,3	39,4
	9 h.			19,8	
	12 h.				42
	17 h.	0,7	2,9		
	19 h.		4,4		
	22 h.		33,0		
	23 h.		40,0	43,5	
	26 h.	2,2	42,0		
	30 h.			43,2	
	48 h.	42,0		43,4	44
	54 h.	42,0			

Si nous comparons les courbes d'extraction aux différentes concentrations en alcool pour un même sérum (voir page 103, courbe n° IV), nous observons d'abord que les temps préparatoires augmentent fortement lorsque la concentration alcoolique diminue. Une différence marquée sépare surtout la concentration alcoolique de 7 p. 100 de la concentration de 8 p. 100 (le temps préparatoire passe de 7 heures à 19 heures pour une différence de 1 p. 100 dans la concentration de l'alcool).

Les périodes pendant lesquelles les extractions s'effectuent sont très difficiles à étudier. Leur durée est relativement très courte et il faut les saisir au cours d'une durée très longue d'observation. A 7 et 8 p. 100 d'alcool leur étude a cependant pu être faite d'une façon satisfaisante dans le cas présent. La courbe représentative est sensiblement une droite pendant la période active d'extraction et, fait intéressant, la pente de cette droite est sensiblement de même ordre de grandeur dans les deux cas bien que les temps préparatoires correspondant à ces deux concentrations soient foncièrement différents.

Après la phase préparatoire le système aboutit très rapidement à un équilibre. Cet équilibre se manifeste par une limite très nette des quantités extraites et cette limite est toujours identique pour les diverses concentrations en alcool (42 à 44 milligrammes).

* Nous pouvons résumer ainsi ces résultats : *Pour un même sérum les concentrations différentes en alcool déterminent essentiellement la durée des temps préparatoires. La durée des périodes actives d'extraction se retrouve identique pour les différentes concentrations alcooliques, de même que la quantité de lipides extraits lorsqu'on parvient à l'équilibre est une constante caractéristique du sérum étudié et elle ne dépend pas de la concentration de l'alcool.*

L'extraction alcool-éthérée dans les conditions de nos expériences prend une allure rappelant celle d'un changement quantitatif brutal qui aboutit à un équilibre rapide dans le temps et cet équilibre est indépendant dans de larges mesures des conditions extérieures.

Etude de la durée d'extraction au-dessous de la concentration optimale.

Un autre point intéressant à étudier est l'augmentation très importante que subit, comme nous l'avons vu, le temps préparatoire lorsque la concentration alcoolique passe au-dessous d'une certaine limite. Ce phénomène est d'une netteté particulière dans le cas du sérum humain.

Pour le sérum humain à toutes les concentrations au-dessus

de 6 p. 100 l'extraction aboutit très rapidement à sa limite. Les phases éthérées se colorent en jaune au bout d'une heure environ et au bout de 4 heures les quantités extraites ne changent plus. A la concentration de 6 p. 100 par contre au bout de 5 heures l'extraction ne s'est pas encore produite, elle ne se produit qu'en 15 à 17 heures à peu près :

TABLEAU XXII

Concentrations en alcool	6 o/o	12 o/o
Lipides extraits en :		
4 h. 30	3	72
17 h.	74	70
Sérum humain n° 3. Chiffres exprimés en milligrammes pour 20 cm ³ de sérum.		

La région optimale d'extraction paraît ainsi être délimitée simplement par l'augmentation de la période préparatoire à l'extraction lorsque la concentration alcoolique est faible. Cette augmentation prend cependant une allure critique pour une certaine concentration et rend à la définition optimale toute sa valeur. Pour les concentrations alcooliques très faibles des phénomènes secondaires (dénaturation des protéides et formation d'émulsions stables) interviennent en outre à la longue avant que la phase préparatoire de l'extraction soit terminée. On n'arrive ainsi à extraire pour ces faibles concentrations en alcool que des quantités variables de graisses qui restent toujours inférieures à l'optimum. Ces phénomènes rappellent ceux observés par MACHEBŒUF et WAHL (1) dans l'extraction prolongée du sérum par l'éther seul.

*Extraction en fonction du temps pour les concentrations
relativement élevées en alcool.*

Si l'on augmente la concentration en alcool au delà de 12 p. 100 on constate que bien loin de favoriser l'extraction,

(1) M. A. MACHEBŒUF et R. WAHL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 736 (1931).

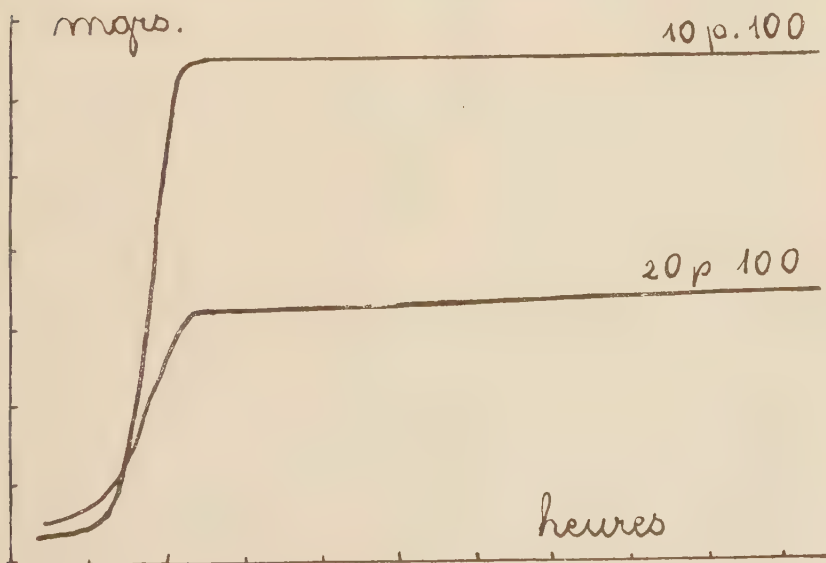
cette haute teneur en alcool la rend moins rapide, moins régulière et même moins complète.

Voici par exemple les résultats obtenus pour un sérum de Cheval, l'extraction étherée étant effectuée en présence de 20 p. 100 d'alcool. Les résultats sont un peu irréguliers par suite de la formation d'émulsions stables, la courbe rapportée ci-dessous est cependant assez concluante :

TABLEAU XXIII

Temps.	15 m.	45 m.	1 h. 30	3 h.	5 h.	8 h.	48 h.
Lipides extraits	6,1	8,1	32	38	42	34	56

Sérum de Cheval n° 3. Chiffres exprimés en milligrammes pour 20 cm³ de sérum. Du même sérum en présence de 10 o/o d'alcool on a extrait dans 1 h. 30 66 mgr. de graisses (pour 20 cm³).
Le chiffre obtenu après 8 heures d'extraction est discordant, cette irrégularité doit être mise sur le compte de la formation d'émulsions stables à cette concentration en alcool.



COURBE n° V

représentative des variations de la quantité de graisses extraite d'un sérum de Cheval en présence de quantités variables d'alcool (10 et 20 p. 120 d'alcool du volume de sérum) en fonction de la durée de contact entre l'éther et le sérum.

Les différences essentielles entre ces concentrations alcooliques relativement élevées (au-dessus de 12 p. 100) et les concentrations plus faibles sont (moins de 12 p. 100) :

1° La diminution de l'extractibilité (qui n'est pas absolument constante) ;

2° L'extraction se fait lentement et n'atteint pas une limite nette même après un temps très long. La courbe d'extraction débute, comme pour les concentrations plus faibles, par une phase préparatoire, moins bien prononcée et par une phase d'extraction brusque, mais la quantité extraite augmente sensiblement avec le temps même après la phase d'extraction rapide. Cette extraction secondaire est très lente et correspond à un processus continu dans le temps. L'extraction secondaire, continue doit être ainsi attribuée à un processus tout à fait différent de celui qui provoque l'extraction discontinue, rapide. L'augmentation lente de l'extraction doit correspondre à des phénomènes secondaires de dénaturation des protéides dont on a d'ailleurs la signature dans l'opalescence du sérum et dans le précipité qui se forme à la longue.

***Étude des changements que subit l'aspect des sérums
dans le temps, pendant l'extraction.***

Étudions maintenant les changements d'aspect qui accompagnent l'extraction en fonction du temps. Cette étude donne des renseignements intéressants sur la nature des opalescences critiques décrites dans un chapitre précédent (voir page 124).

Nous avons observé l'aspect des phases sériques immédiatement après leur séparation des phases étherées et quelques heures plus tard. Cet aspect change en effet souvent dans les heures qui suivent la séparation des phases.

Les résultats se laissent résumer de la façon suivante :

1° *Dans la phase préparatoire à l'extraction* l'aspect des phases sériques passe par trois phases :

a) Si l'on sépare l'éther de la phase hydroalcoolique après une durée de contact très courte, la phase hydroalcoolique est limpide et elle reste limpide lorsque l'éther dissous s'évapore.

b) Si l'on sépare les phases après une durée de contact plus

TABLEAU XXIV

1. Sérum de Cheval n° 3 (Extraction en présence de 10 o/o d'alcool).						
Durée d'extraction.	15 m.	45 m.	1 h. 8	1 h. 30	8 h.	48 h.
Aspect immédiat	op	op	op	limp	limp	limp
Aspect ultérieur	pr	pr	pr	limp	limp	limp
Quantités extraites	3,6	4,7	17,5	64,5	64	66

2. Sérum de Cheval n° 4 (Extraction en présence de 6 o/o d'alcool).				
Durée d'extraction.	1 h. 30	17 h.	26 h.	48 h.
Aspect immédiat	limp	op	op	limp
Aspect ultérieur	limp	op	pr	limp
Quantités extraites	0,6	0,7	2,2	42

Les quantités extraites sont toujours exprimées en milligrammes pour 20 cm³ de sérum.
 Nous désignons par : op = opalescent ; pr = précipité ; limp = limpide.
 Aspect immédiat = aspect de la phase hydroalcoolique immédiatement après la séparation des phases ; aspect ultérieur = aspect quelques heures plus tard.

longue, variable suivant les sérums, la phase sérique est opalescente dès la séparation et cette opalescence persiste après l'évaporation de l'éther dissous dans le sérum alcoolisé.

c) Si l'on sépare les phases après une durée de contact encore plus longue, mais cependant encore insuffisante pour produire l'extraction, l'opalescence qui existait lors de la séparation des phases se résout, au fur et à mesure que l'éther dissous s'évapore, en un précipité qui monte à la surface et qui est soluble dans l'éther.

2° Si l'on sépare les phases après que l'extraction s'est produite :

le sérum a retrouvé sa limpidité qu'il garde ensuite indéfiniment.

Dans les conditions où nous nous sommes placés ici, en présence d'une quantité d'alcool égale à 6 p. 100 du volume de sérum, la phase préparatoire à l'extraction est très longue ; c'est ce fait qui a permis de saisir aussi nettement le phénomène. Si par contre on opère l'extraction en présence de 10 p. 100 d'alcool, la rapidité avec laquelle évolue le phénomène, rend les deux premières phases insaisissables pour le sérum étudié ici.

On peut résumer l'essentiel de ces faits comme suit :

Lorsque l'on sépare les phases après un temps de contact suffisant le processus continue spontanément vers la libération des graisses. *L'association alcool-éthérée doit en quelque sorte mordre le système lipoprotéidique qui, après un mordantage suffisant, évolue spontanément vers la lipophanérose.*

Dans le tableau n° XXIV sont rassemblés les résultats expérimentaux obtenus sur cet ensemble de faits :

Sur la nature des opalescences inextractibles par l'éther

Les cas que nous avons traités ci-dessus se rapportent à des sérums typiques. Cependant, comme nous l'avons déjà dit, les phénomènes sont assez variables pour une même espèce. Il y a en particulier des sérums dont les lipides s'extraient mal, d'autres pour lesquels les courbes d'extraction en fonction des concentrations alcooliques sont irrégulières. Pour tous ces sérums les opalescences persistent même après l'extraction ou bien des émulsions stables se forment qui montent à la surface de la phase hydroalcoolique. Il y a une relation manifeste entre l'inégalité de l'extraction des lipides d'une part et la production de ces opalescences persistantes d'autre part.

Pour illustrer ces faits nous rapportons ci-dessous quelques exemples (voir tableau XXV).

Il est très difficile d'interpréter ces phénomènes, leur production paraît être liée à la même cause que la diminution de l'extractibilité que présentent certains sérums aux concentrations élevées. Ici aussi en tout cas nous retrouvons les deux faits fondamentaux qui caractérisent les phénomènes observés aux concentrations élevées :

La diminution de l'extractibilité et la formation d'opalescences persistantes.

TABLEAU XXV

1. Sérum de Cheval n° 5 (Durée d'extraction : 24 heures).					
Concentrations en alcool.	6	8	10	12	14
Aspect après la séparation des phases	op	1	1 ?	op	op ?
Graisses extraites	11	40	14	15	35
Les chiffres sont exprimés en milligrammes et se rapportent à 20 cm ³ de sérum. Comme on le voit, l'unique point de limpidité coïncide avec l'extraction maximale, pour toutes les autres concentrations l'extraction est moins forte et le sérum reste opalescent d'une façon permanente.					

2. Sérum de Cheval n° 6 (Durée d'extraction : 24 heures).			
Trois fois 30 cm ³ de sérum furent extraits exactement dans les mêmes conditions en série, les volumes d'alcool, de sérum et d'éther furent mesurés avec les mêmes pipettes.			
Concentrations en alcool.	10 0/0	10 0/0	10 0/0
Aspect après la séparation des phases	op	op	op
Graisses extraites	16	29	17
Les chiffres sont exprimés en milligrammes et se rapportent sur 20 cm ³ de sérum.			
Deux faits caractérisent ces chiffres : 1. La variabilité extrême des quantités extraites dans les mêmes conditions ; 2. L'extractibilité très faible.			
Nous désignons par : 1 = limpide ; 1 ? = moins limpide ; op ? = opalescent ; op = très opalescent.			

Un troisième caractère important est constaté dans ces cas : la disparition quasi complète des lécithides des graisses extraites.

La production de séries aussi irrégulières que celles que nous rapportons ci-dessus, ne peut être liée qu'à des phénomènes purement accidentels (1) se faisant dans un système irréversi-

(1) Du point de vue thermodynamique en effet ces séries irrégulières ne se laissent interpréter qu'en supposant que dans l'évolution du phénomène des fluctuations se laissent valoir et que, le processus aboutissant à des faux équilibres, ces fluctuations donnent des résultats accidentels. Le moyen statistique est ainsi faussé par des fluctuations, mais ces fluctuations ne peuvent se faire valoir que dans des états intermédiaires qui eux ne peuvent être que des faux équilibres ne correspondant pas à l'entropie du système (l'entropie est par définition le résultat d'un moyen statistique dans sa déduction de la loi cinétique des gaz).

ble. La formation secondaire d'émulsions inextractibles par l'éther est l'explication qui nous paraît le plus vraisemblable. Cette explication rend à la fois compte : *a*) des opalescences persistantes, *b*) de la diminution de l'extractibilité et *c*) de l'existence de ces séries absolument irrégulières.

Résumé et rappel des conclusions du présent chapitre.

L'éther en présence de petites quantités d'alcool libre et extrait du sérum une forte proportion (50 p. 100 environ) des graisses qu'il contient. La quantité de graisses extraites semble être une constante caractéristique du sérum considéré, indépendante dans de larges mesures des conditions extérieures : concentrations en alcool, volume d'éther. *L'extraction évolue dans le temps.* Après une phase préparatoire parfois très longue, au cours de laquelle l'éther n'extrait que très peu de graisses, l'extraction s'amorce puis se fait en un temps relativement très court (phase d'extraction active). La durée des phases préparatoires seule semble dépendre des concentrations alcooliques, la période d'extraction active semble évoluer toujours de la même façon pour un même sérum et elle aboutit toujours à la même limite pour des concentrations alcooliques foncièrement différentes. Ce n'est que pour des concentrations alcooliques relativement élevées (au-dessus de 12 p. 100) que des phénomènes secondaires (dénaturation des protéides, formation d'émulsions stables) semblent troubler le processus. Il n'est même pas nécessaire de laisser en contact permanent la phase éthérée et la phase sérique et, si le contact était déjà suffisamment prolongé, on peut enlever l'éther surnageant sans interrompre l'évolution de la lipophanérose qui se fait spontanément vers la séparation des graisses sous forme de gouttelettes.

L'extraction alcooléo-éthérée, pratiquée comme nous le faisons ici, ne modifie pas sensiblement les protéides sériques; c'est ainsi qu'après l'extraction on trouve les mêmes teneurs en globulines et albumines que dans le sérum original.

Pour quelques sérums les phénomènes évoluent d'une façon irrégulière. Ces sérums forment toujours des émulsions et des précipités.

QUATRIÈME PARTIE

INTERPRÉTATION DES FAITS ET CONCLUSIONS THÉORIQUES SUR LA NATURE DES COMPLEXES LIPOPROTÉIDIQUES ET PROTÉIDO-PROTÉIDIQUES

CHAPITRE PREMIER

NATURE DES COMPLEXES LIOPROTÉIDIQUES ET PROTÉIDOPROTÉIDIQUES

Dans l'étude historique et expérimentale qui précède, nous avons abordé le problème des complexes lipoprotéidiques et protéidoprotéidiques. Les caractères physico-chimiques des deux groupes de complexes se touchent en de nombreux points et les faits constatés dans l'un des domaines aident à la compréhension de ceux qui se révèlent dans l'autre.

Il est un fait certain : *des liaisons réunissent en des systèmes plus complexes, les constituants élémentaires des protéides entre eux et les protéides avec les lipides.*

Résumé bref des caractères physico-chimiques des complexes colloïdaux du sérum.

Les caractères physico-chimiques spéciaux des lipides du sérum peuvent être résumés brièvement ainsi :

Solution homogène (1) et extrêmement stable dans l'eau ; inextractibilité par l'éther sans alcool ; entraînement avec les protéides dans des systèmes de précipitation bien caractérisés (complexe de MACHEBŒUF, etc.).

Nous avons longuement traité dans un résumé historique les caractères des complexes protéidoprotéidiques. Les faits essentiels qui prouvent leur existence sont les suivants :

Les constantes physiques, comme la constitution chimique des grandes fractions des protéides du sérum subissent des variations continuelles au cours des fractionnements.

(1) Ce terme : « solution homogène » concerne les propriétés optiques du système dans lequel on ne peut pas apprécier une discontinuité optique.

L'analyse chimique indique pour les diverses fractions des albumines ou des globulines de compositions différentes. Des unions, assez labiles, entre les protéides élémentaires semblent évoluer dans certaines conditions soit par des séparations, soit peut-être par des recombinaisons successives. Ceci ressort surtout des faits suivants : 1° Naissance de fractions solubles au cours de la dialyse des euglobulines ; 2° modifications que subissent les courbes de solubilité au cours des divers fractionnements des protéides ; 3° changements complexes des poids moléculaires observés à la suite de changements parfois insignifiants dans les conditions du milieu.

Je n'oserais, par contre, me prononcer en ce qui concerne la signification du phénomène observé par SÆRENSEN : augmentation de la solubilité des protéides lorsqu'augmente la quantité de protéides en excès mise en présence du solvant. La théorie de SÆRENSEN : système de composants réversibles et dissociables (voir page 31) est basée principalement sur ce phénomène. WO. OSTWALD et ses élèves obtiennent des résultats analogues pour la plupart des hydrogels minéraux et pour ces auteurs on doit admettre un état d'agrégation variable du système colloïdal et les courbes de solubilité complexes ne dépendraient que de la dispersion micellaire. Cette conclusion n'est peut-être pas aussi foncièrement différente de celle de SÆRENSEN qu'elle peut le paraître tout d'abord.

Je voudrais encore insister sur un caractère fort important des complexes lipoprotéïdiques et protéïdoprotéïdiques, caractère que l'on est tenté de désigner par les termes « *rigidité* » ou « *rigidité de constitution* » (1). Les grandes fractions : globu-

(1) Ces complexes, bien que probablement métastables, présentent des domaines de stabilité relative, de rigidité de leur constitution. La notion de viscosité chimique est déjà nettement précisée dans des cas bien différents de celui qui nous occupe. Il ne s'agit pas ici d'une simple viscosité chimique qui freinerait les modifications des complexes : ici, les modifications ne se produisent pas du tout entre certaines limites et ce n'est que lorsque les conditions du milieu sortent de ces limites que se font brusquement les modifications qui évoluent alors rapidement. Les phénomènes rappellent plutôt un équilibre physique métastable, tel qu'un équilibre cristallin, c'est à cause de ça qu'il nous semble de les pouvoir bien caractériser par une comparaison mécanique : la rigidité d'un solide non élastique. On pourrait dire pour vulgariser cette conception : les complexes, bien que métastables, résistent complètement ou cassent.

line et albumine ne sont pas des chimères — ce sont de grands complexes présentant des caractères physico-chimiques différents, bien définis pour tous les sérums de mammifères. La limite de précipitation nette obtenue par la méthode de HOFMEISTER (voir page 16) et une différence sensible entre des points isoélectriques moyens (voir page 23), ainsi qu'une différence appréciable entre les pouvoirs rotatoires séparent la globuline de l'albumine et tendent à donner à ces deux systèmes complexes un caractère chimique. La même constance caractérise les fractions lipidiques entraînées avec les deux grandes fractions du système lipoprotéidique « albumine » et « globuline ». Pour montrer combien nette est la « rigidité » de ces complexes, je rappellerai un fait cité ci-dessus : en présence de 9 p. 100 d'alcool environ, après une extraction étherée prolongée, le rapport quantitatif albumine sur globuline reste inchangé (voir page 17). Ces ensembles ne sont cependant pas très stables et, en présence de certaines modifications peu importantes du milieu ambiant, ils paraissent pouvoir se modifier assez facilement. Ainsi paraissent agir la dilution et même peut-être la précipitation saline. Le terme « système rigide » ne veut cependant pas toujours dire « système stable », le caractère essentiel d'un système rigide est de manifester des variations discontinues, quantiques, souvent irréversibles. Si les conditions extérieures varient, le système rigide reste inchangé entre certaines limites de ces variations, mais ces limites peuvent être plus ou moins éloignées.

J'ai cité ci-dessus les constantes physiques et les propriétés chimiques qui permettent de considérer la globuline et l'albumine comme des complexes d'une existence réelle, c'est-à-dire doués d'une certaine stabilité. Il y a des exemples où le système évolue d'une façon discontinue, par changement quantique, comme un système rigide. Citons pour le moment une expérience très démonstrative de SVEDBERG et SJOERGEN (1). En étudiant le poids moléculaire des protéides par la méthode d'ultra-centrifugation, ces auteurs observent qu'en fonction des variations du pH le poids moléculaire des albumines et des globulines reste constant entre des limites assez larges. Ce n'est

(1) The SVEDBERG et B. SJOERGEN, *Jour. Amer. Chem. Soc.*, 52, 2855 (1930).

qu'au-dessus de pH 9 et au-dessous de pH 4 que le poids moléculaire des protéides du sérum semble subir un fractionnement discontinu — ce fractionnement est d'ailleurs réversible.

Tous ces exemples s'accordent mal avec la supposition de complexes labiles, échangeant entre eux des constituants sous la moindre influence (SØRENSEN).

CHAPITRE II

NATURE DES FORCES QUI INTERVIENNENT DANS LA CONSTITUTION DU SYSTÈME LIPOPROTÉIDIQUE DU SÉRUM

Abordons maintenant le problème de la nature des forces qui interviennent dans la production de ces complexes. La solution de ce problème n'est pas encore définitive, elle n'est d'ailleurs vraisemblablement pas unique, car des forces diverses peuvent intervenir ; cependant on peut déjà préciser certains caractères qui peuvent orienter nos idées.

Quelques remarques sur le problème colloïdal.

Nous n'entreprendrons pas ici toute la discussion du problème de constitution des solutions aqueuses des substances de poids moléculaire élevé, cependant, pour situer convenablement le cas spécial du système lipoprotéidique, il faut faire un résumé bref du problème colloïdal.

On a souvent l'habitude de rapprocher dans la définition de l'état colloïdal les deux termes : « *fausse solution* » et « *agrégats moléculaires* ». On considère les solutions colloïdales comme des systèmes en fausse solution où les particules dispersées seraient constituées par des agrégats moléculaires. Les deux termes « *fausse solution* » et « *agrégats moléculaires* » devraient être, à mon avis, considérés séparément parce que ces deux termes ne doivent pas nécessairement s'associer. Depuis que l'examen ultramicroscopique est mis en œuvre systématiquement pour l'étude des solutions, nous savons par exemple que des

solutions cristalloïdes classiques, telle une solution aqueuse de saccharose, peuvent contenir des agrégats moléculaires (1).

L'idée de J. LÆB (2) était peut-être plus logique. Le terme de fausse solution caractérise pour lui l'essentiel d'une solution colloïdale. Ce terme serait basé sur des considérations d'ordre dynamique. Les fausses solutions, ou solutions colloïdales, seraient maintenues dans un état de dispersion métastable par des couches électriques doubles. Les vraies solutions, ou solutions cristalloïdes, seraient produites par l'affinité inhérente à la constitution moléculaire reliant solvant et corps dissous par des forces de valence secondaire (3). En se basant sur cette conception J. LÆB considère les protéides en solution aqueuse comme des cristalloïdes, la dispersion de ces corps en solution aqueuse pouvant être d'ailleurs différente suivant leur nature et les conditions du milieu.

Actuellement cependant, le problème n'a plus de caractères aussi tranchés qu'autrefois. Un grand mouvement uniciste règne au sujet des phénomènes colloïdaux et l'on tend à expliquer les faits par les lois de la chimie classique. La couche électrique double, tellement caractéristique des colloïdes, serait le plus souvent due à des phénomènes purement chimiques. C'est ainsi qu'un agent de peptisation (4) tel que l'acide chlorhydrique, agissant sur un gel d'hydrate ferrique, amène une ionisation partielle des molécules des particules colloïdales; les ions formés restent fixés à la surface des particules, dont ils favorisent la dissolution en donnant, par surcroît, naissance à la couche électrique double (5) (6). Il serait d'ailleurs assez artificiel de vouloir distinguer entre les forces qui maintiennent en solution les

(1) LECOMTE DU NOUY, *Équilibre superficiel des solutions colloïdales*, édit. Masson, Paris (1929), p. 199.

(2) J. LÆB, *Les protéines*, édit. F. Alcan, Paris (1924), pp. 16-22. En particulier l'auteur dit : *La distinction capitale entre l'état colloïdal et l'état cristalloïde, réside dans la nature des forces qui maintiennent en solution.*

(3) Le terme de valence secondaire répond dans le cas considéré à la définition de LANGMUIR et nous reviendrons plus loin sur la conception de cet auteur.

(4) On appelle *agent de peptisation* un réactif capable de transformer un gel en un sol.

(5) R. ZSIGMONDY, *Kolloidchemie*, I (Leipzig, 1925), p. 177.

(6) A. RABINOVITSCH et KARGIN, *Ztschr. f. physik. Chemie*, **133**, 202 (1928).

ions ferriques de ces particules colloïdales et celles qui maintiennent en solution les ions ferriques d'une solution de chlorure ferrique (1).

ZSIGMONDY satisfait aux habitudes des chimistes et de la chimie classique, quand il fait une classification unique des solutions où des intermédiaires relient dans une série absolument continue solutions cristalloïdes, solutions colloïdales et suspensions grossières. Dans cette classification il ne tient compte que de la taille des particules et des propriétés qui en résultent. La classification en groupes divers des forces qui interviennent dans la dispersion est en effet assez subtile et n'intéresse pas beaucoup le chimiste qui voudrait reconnaître la constitution des solutions par des caractères facilement accessibles (2).

Caractères physiques des colloïdes biologiques.

Pour les biologistes une distinction fondamentale s'impose. La plupart des colloïdes artificiels et tous les colloïdes minéraux présentent des différences fondamentales avec les colloïdes contenus dans la matière vivante (protéides et polyholosides).

En ce qui concerne les solutions aqueuses des protéides, J. LÆB (3) analyse bien ces différences. Le comportement vis-à-vis des électrolytes établit une distinction capitale. Tous les colloïdes artificiels sont précipités de leurs dispersions aqueuses par de faibles quantités d'électrolytes, tandis que la précipitation des solutions aqueuses des protéides nécessite de très fortes concentrations en électrolytes.

(1) D'ailleurs ZSIGMONDY mentionne que les solutions de chlorure ferrique contiennent aussi des particules visibles à l'ultramicroscope.

(2) Une généralisation aussi excessive reste quand même discutable. Ceci sort des cadres de ce travail et je voudrais simplement noter que dans ces conditions on ne voit pas bien ce qui est colloïde et ce qui reste cristalloïde. Du point de vue thermodynamique, il doit persister une différence entre une solution de saccharose avec des molécules polymérisées et une solution d'or colloïdal. Ce qui est sûr, c'est qu'à côté de la taille des particules, d'autres propriétés interviennent basées sur des différences purement dynamiques (réversibilité et en dernière analyse nature des forces qui interviennent dans la dispersion).

(3) J. LÆB, *Les protéines*, édit. F. Alcan, Paris (1924).

L'autre point précisé par J. LOEB, au sujet du comportement des protéides vis-à-vis des acides et des bases, n'établit pas une vraie distinction. Les protéides, dans leurs réactions avec les acides et les bases, suivent la loi d'action de masse tandis que les colloïdes artificiels réagissent le plus souvent avec les différents réactifs chimiques suivant un mode plus complexe en suivant plus ou moins les formules empiriques de l'adsorption. Cependant les colloïdes artificiels peuvent aussi réagir parfois dans des proportions moléculaires constantes avec les électrolytes (1); H. KAUTSKY (2) qualifie une telle réaction de *permutoïde*. Dans une réaction permutoïde il y aurait pénétration des réactifs à l'intérieur des particules, tandis que les formules d'adsorption seraient applicables aux réactions qui se font seulement à la surface des particules.

Des travaux de J. LOEB (3) ressort un fait essentiel : *La stabilité de leurs solutions aqueuses et leurs réactions avec les acides et les bases rapprochent les protéides plutôt des cristalloïdes que des colloïdes*. Le comportement des protéides en solution aqueuse n'est cependant pas toujours aussi simple (4). Les protéides forment avec une facilité extrême de gels demi-solides, ils tendent en outre à s'entraîner mutuellement dans des complexes plus ou moins stables. A ces faits J. LOEB donne une explication très intéressante (5). Il fait entrer en jeu la constitution hétérogène des polypeptides. A la surface d'une molécule de protéide en solution aqueuse, les groupements fortement polaires : acide,

(1) R. ZSIGMONDY, *Kolloidchemie*, I (1925), p. 194 : ZSIGMONDY en étudiant les solutions colloïdales d'acide stannique et d'hydrate ferrique, montre que dans le cas de micelles de structure lâche, les réactifs peuvent pénétrer à l'intérieur de ces micelles ; c'est ainsi que la solution colloïdale d'acide stannique est précipitée par des quantités équimoléculaires de Ca, Ba et Cu (++). Des phénomènes exactement de même ordre caractérisent les réactions des protéides avec les acides et les bases.

(2) H. KAUTSKY, *Z. f. anorg. Chemie*, **147**, 81 (1925).

(3) J. LOEB, *Les protéines*. Edit. : F. Alcan, Paris, 1924. *La théorie des phénomènes colloïdaux*. Edit. : F. Alcan, Paris, 1925.

(4) Je ne voudrais pas insister sur les propriétés qui résultent seulement de la taille des particules et qui ont donné naissance dans l'idée de GRAHAM à la distinction entre colloïde et cristalloïde. Les protéides, comme toutes les substances à poids moléculaire élevé, diffusent lentement et ne traversent pas le parchemin et la membrane animale.

(5) J. LOEB, *Les protéines*, p. 23-24.

amine, amide, etc. sont liés par des forces de valence secondaire (1) aux molécules de l'eau — ces groupements sont donc en dissolution vraie. Les fonctions carbure d'hydrogène n'ont par contre aucune affinité pour l'eau et ont une tendance spéciale à se réunir entre elles. Les gels de protéïdes seraient constitués par une dissolution mutuelle des fonctions carbure d'hydrogène des différentes molécules de protéïdes et une dissolution aqueuse partielle de ces mêmes molécules par leurs groupements polaires. Cette explication est d'autant plus intéressante à reproduire ici qu'une représentation ressemblant en quelques points sera invoquée par nous pour expliquer le comportement physico-chimique spécial du système lipoprotéïdique.

Théories physico-chimiques se rapportant à la structure des protéïdes.

La structure des tissus animaux et végétaux donne de nouveaux renseignements très intéressants sur la constitution physique des protéïdes.

Il est intéressant de noter qu'un terme, devenu d'un emploi général en physico-chimie colloïdale, a pris naissance dans l'observation des tissus. Nous voulons parler de la micelle, définie par NÆGELI (2) comme l'unité, la plus petite particule, intervenant dans la constitution de la matière vivante.

Cette notion a subi depuis des remaniements, la micelle est devenue l'unité des solutions colloïdales en général, c'est-à-dire le granule de COTTON et MOUTON (3) portant son atmosphère d'ions adsorbés. Il faut cependant préciser que la micelle de NÆGELI se rapportait à la matière vivante et était supposée constituée par un agrégat microcristallin de plusieurs molécules. NÆ-

(1) Les termes « *valence secondaire* » et « *groupement polaire* » seront précisés plus loin dans notre exposé.

(2) C. V. NÆGELI, *Staerkekörner*. München (1858).

(3) COTTON et MOUTON, *Les ultramicroscopes et les objets ultramicroscopiques*, édit. Masson, Paris (1906). Ces auteurs disent : *Nous appellerons granule, la particule visible chargée d'électricité et nous envisagerons d'appeler micelle l'ensemble formé par le granule chargé et par ce qui le neutralise.*

GELI avait observé la biréfringence et l'anisotropie de nombreux produits d'origine biologique et, comme ces propriétés apparaissent quand il y a un agencement cristallin des constituants élémentaires du système, NÆGELI supposait que le plus petit constituant de la matière vivante était un élément cristallin. Puisque cet élément cristallin hypothétique était nécessairement constitué de plusieurs espèces chimiques différentes, NÆGELI le désigna par un terme spécial : « micelle ».

La représentation de NÆGELI fut confirmée par des travaux ultérieurs (1-2). Cette confirmation devint particulièrement nette quand les méthodes d'analyse des cristaux par les rayons X furent appliquées aux produits d'origine biologique. Pendant longtemps cette méthode ne fut appliquée avec succès qu'aux polyholosides. Dans le cas des protéides un seul fait se présentait assez net en faveur d'une théorie de structure microcristalline : l'anisotropie des fibres musculaires. Plus tard on a pu obtenir des spectres caractéristiques avec la fibroïne de soie, le tendon et le tissu musculaire (3). Tout à fait récemment enfin, des résultats significatifs furent obtenus dans l'étude aux rayons X du collagène et de la gélatine. L'origine de ces travaux fut la mise en évidence du fait suivant : Les changements que subissent le collagène et la gélatine au cours des chauffages ne sont pas dus à des hydrolyses de groupements chimiques (4). Ce fait serait une preuve pour la théorie de STIASNY (5) qui considère la transformation sous l'influence du chauffage du collagène en gélatine et de la gélatine en gélatones comme étant due à la thermolyse de valences secondaires. Ces faits trouvent leurs parallèles dans l'observation des spectres de rayons X. L'analyse aux rayons X indique en effet, pour le collagène une structure cristalline (6), la structure cristalline pour la gélatine n'existe que quand la gélatine est sous tension (7), la gélatine perd enfin définitivement toute structure cristalline si on continue à chauf-

(1) H. AMBRONN, *Kolloidzeitschrift*, **9**, 147 (1911), **20**, 173 (1917).

(2) SCHMIDT, *Die Naturwissenschaften*, **16**, 900 (1928).

(3) R. O. HERZOG, *Ber. d. d. chem. Ges.*, **58**, 2228 (1925) et **59** 2487 (1926).

(4) O. GERNGROSS, *Ber. d. d. chem. Ges.*, **63**, 1603 (1930).

(5) STIASNY, *Science*, **57**, 483 (1923).

(6) R. O. HERZOG et W. JANCKE, *Ber. d. d. chem. Ges.*, **53**, 2162 (1920).

(7) P. GERNGROSS et J. R. KATZ, *Kolloidzeitschrift*, **39**, 181 (1929).

fer (1). Dans l'observation des propriétés physiques des solutions de gélatine, un troisième groupe de faits complète les résultats obtenus (1). Parallèlement avec la disparition de la structure cristalline la gélatine en solution aqueuse perd de plus en plus sa qualité physique de former des gels et présente des poids moléculaires moyens qui diminuent progressivement.

Nous insistons sur ces faits qui sont des preuves puissantes de la possibilité de l'existence d'une structure physique particulière des protéides naturels. Cette structure physique s'approche, dans le cas de la gélatine, d'une structure microcristalline qui aurait la propriété particulière d'être en faux équilibre et d'évoluer d'une façon irréversible vers la destruction à partir des produits naturels jusqu'aux produits dénaturés.

A part ces exemples, l'anisotropie, la biréfringence et l'existence de spectres de rayons X restent l'exception pour les gels des protéides naturels. NAEGELI expliquait ce fait en supposant que dans ces gels les micelles ne sont pas distribuées d'une façon géométrique dans l'espace, mais qu'elles forment par des réunions irrégulières une structure en réseau.

Hypothèses sur la structure des protéides naturels.

1° Hypothèse de K. H. MEYER.

L'absence de spectres de rayons X ou d'autres preuves en faveur d'une structure physique équilibrée dans le cas de la plupart des protéides naturels constitue la base de la théorie de K. H. MEYER (2). D'après cet auteur, l'unité de constitution serait une micelle, mais une micelle d'une nature spéciale. De nombreuses espèces chimiques prendraient part à sa constitution, ces espèces chimiques constitueraient les chaînes de valence primaire. Les différentes molécules linéaires : polypeptides et lipides, seraient réunies entre elles par des forces physiques de cohésion (3). Etant donné la constitution hétérogène de ces

(1) O. GERNGROSS, K. HERMANN et W. ABITZ, *Biochem. Ztschr.*, 228, 409 (1930).

(2) K. H. MEYER, *Biochem. Ztschr.*, 214, 253 (1929).

(3) K. H. MEYER, *Biochem. Ztschr.*, 208, 1 (1929). En particulier : *Die Kraefte, welche die Hauptvalenzketten zum Micell zusammenhalten, sind nach unserer Meinung gleicher Art, wie die Van der Waal'schen Kraefte in Gasen...*

micelles, l'auteur les appelle *des micelles de mélange* (Mischmizellen). Deux points essentiels caractériseraient encore les micelles qui constituent la matière vivante et en particulier les protéides du sérum :

1° L'agencement irrégulier des constituants moléculaires de ces micelles ; 2° La flexibilité des chaînes de polypeptides.

La complexité de constitution et l'agencement irrégulier expliquent l'absence d'éléments cristallins.

Une précision s'impose ici : l'anisotropie et la biréfringence prouvent que les unités qui constituent le système sont disposées dans l'espace d'une façon géométrique. Dans les fibres de cellulose par exemple des chaînes linéaires rigides sont arrangées parallèlement l'une par rapport à l'autre et les spectres de rayons X obtenus dans certaines conditions permettent de révéler l'existence d'éléments cristallins. Un élément cristallin est une unité dont les constituants élémentaires sont des atomes et éventuellement des molécules qui gardent dans l'espace une position relative fixe et invariable. Un constituant élémentaire quelconque d'un système formé de molécules complexes de structure rigide et qui se répète identique à lui-même un grand nombre de fois est donc assimilable à un élément cristallin. Pour la constitution d'un cristal à proprement parler un deuxième phénomène doit intervenir ; c'est la disposition géométrique des éléments cristallins dans l'espace, mais les éléments cristallins tout en existant peuvent avoir une disposition purement statistique.

NAEGELI supposait l'existence obligatoire d'éléments cristallins dans la matière vivante, c'étaient ses micelles. Dans les fibres les éléments cristallins se disposent d'une façon géométrique, dans les gels d'une façon irrégulières, mais les unités restent toujours rigides. Nous avons vu précédemment la belle confirmation de la théorie de NAEGELI dans le cas de protéides d'un caractère particulier : les collagènes et les gélatines.

K. H. MEYER refuse de considérer les micelles de mélange, constituants élémentaires de nos systèmes lipoprotéidiques, comme des unités rigides. Il invoque deux faits dans son raisonnement :

A) *La complexité du système.* — Ceci explique peut-être la difficulté de formation de vrais cristaux, mais n'exclut nullement que les éléments soient de structure rigide.

B) *Des considérations thermochimiques.* — Elles sont basées sur le fait constaté par FISCHER et WREDE (1) : la cyclisation des peptides sans aucune manifestation énergétique. L'énergie thermique développée dans la formation d'une fonction amide entre deux molécules de glycocolle est exactement la même que celle qui se dégage au cours de la formation du dicétopipérazide à partir de la glycyle-glycine. Je ne pense cependant pas que l'on puisse généraliser des dipeptides aux grands complexes que sont les protéides naturels. En général la rigidité des systèmes augmente avec le poids moléculaire des constituants; les polypeptides qui interviennent dans la constitution des « micelles de mélange » peuvent avoir en outre une influence réciproque augmentant la rigidité.

Conception de SOERENSEN (2).

La conception de SOERENSEN est bien conforme à la représentation structurale proposée par K. H. MEYER. Nous avons vu les résultats du fractionnement physico-chimique et de l'analyse chimique des protéides du sérum sur lesquels est basée cette conception.

L'auteur admet deux ou plusieurs polypeptides différents comme constituants individuels des molécules de protéides. Plusieurs de ces polypeptides seraient réunis d'abord ensemble pour former secondairement des réunions entre ces polymères de polypeptides individuels — la formule générale des protéides naturels serait donc : $P^xQ^y...$, etc., où P et Q sont des polypeptides différents. Les exposants x et y seraient extrêmement variables et ainsi, suivant les conditions de concentration en sels minéraux, en protéides et en ions hydrogène un grand nombre de complexes différents pourraient exister où les composants individuels seraient en quantités différentes :

$$P^xQ^y \dots Z^n = P^aQ^b \dots Z^m \dots + \dots$$

Le système serait doué d'une labilité extrême et les modifica-

(1) FISCHER et WREDE, *Berl. Sitzungsber.* (1904), p. 15.

(2) S. P. L. SOERENSEN, *C. R. du laboratoire Carlsberg*, Vol. 18, n° 5 (1930).

tions produites par le moindre changement dans les conditions, seraient réversibles. C'est ce que l'auteur appelle : *Système de composants réversible et dissociable*.

SOERENSEN d'ailleurs ne se prononce pas définitivement sur la nature des forces qui interviennent dans la polymérisation des polypeptides simples et la réunion secondaire de ces polymères. Il leur donne respectivement le nom de chaînes de valence primaire et de chaînes de valence secondaire. Le terme de valence secondaire, tel que SOERENSEN l'emploie sans autre précision, peut supposer autant une force de cohésion qu'une force chimique. SOERENSEN avance que ce sont peut-être des forces analogues à celles qui interviennent dans la production des composés de WERNER. Au sujet des lipides contenus dans le système lipoprotéidique, son avis est encore plus hésitant, mais il suppose volontiers qu'ils sont maintenus fixés aux polypeptides par les mêmes forces qui maintiennent ces derniers unis les uns aux autres.

La représentation de SOERENSEN repose au fond sur le même principe que celle de K. H. MEYER. Elle apporte plus de précision en ce qui concerne l'explication du comportement physico-chimique des protéides en supposant des polypeptides individuels plus ou moins polymérisés réunis dans des complexes réversibles et dissociables — elle est plus hésitante sur la nature des forces qui produisent ces complexes. La représentation structurale de micelles, lâches, molles et irrégulières s'accorde bien avec la supposition chimique de complexes labiles, dissociables et réversibles — la structure lâche évite en effet la persistance d'états métastables, de faux équilibres.

Les deux conceptions sont concordantes, mais la différence qu'elles présentent avec la représentation originelle de NAEGELI sur les micelles a une grande importance pratique et théorique. La micelle de NAEGELI, complexe rigide, cristallin, définit un système doué d'une certaine viscosité chimique — elle permet de supposer le maintien presque indéfini d'états métastables. Quelle que soit la nature des forces qui interviennent dans sa constitution, un tel système est relativement stable et peut subir des changements discontinus et spontanément irréversibles.

Nous avons déjà insisté précédemment sur certains faits qui prouvent que le système lipoprotéidique du sérum est doué d'une

certaine stabilité et qu'il est capable de maintenir presque indéfiniment des états métastables (pages 116, 117, 118). En nous basant sur nos derniers travaux sur le système lipoprotéidique, nous sommes amenés à faire une représentation de ce système qui concorde plutôt avec l'idée originelle de NAEGELI : *Ce sont vraisemblablement des particules douées d'une certaine rigidité, dans un équilibre physique particulier, qui constituent les « molécules » des protéides naturels dispersées dans le sérum.*

Cette conclusion s'impose lorsqu'on analyse les résultats obtenus au cours de l'étude de l'extraction alcool-éthérée du sérum.

**Discussion des résultats obtenus
dans l'extraction alcool-éthérée du sérum.**

Nous avons vu (page 79 à page 112) que de petites quantités d'alcool confèrent à l'éther la propriété d'extraire du sérum une assez forte proportion des lipides qui s'y trouvent.

Nous avons étudié ce phénomène en nous plaçant à divers points de vue.

Nous avons tout d'abord étudié ce qui se passe en un temps donné pour des concentrations variables en alcool. Cette étude a permis de tracer la courbe représentative des variations de la quantité de lipides extraits par l'éther en un temps donné (6 heures) en fonction de la concentration alcoolique. Cette courbe présente une discontinuité très brusque (voir page 83) :

Si la concentration alcoolique est très faible (moins de 6 p. 100) l'éther n'extraît pratiquement pas de lipides. Si la concentration dépasse une certaine valeur (seuil d'extraction) la quantité de lipides extraits devient brusquement très élevée puis reste constante lorsque croît la concentration en alcool (1). Cette discontinuité est nette et ce fait nous a semblé tout d'abord très troublant car il est peu habituel de voir un phénomène physico-chimique évoluer d'une façon aussi discontinue.

(1) Cette zone de constance (zone 2) se prolonge jusqu'à une concentration critique maximale pour laquelle se manifeste une nouvelle discontinuité qui correspond à une baisse sensible du pouvoir extractif de l'éther.

Cette discontinuité frappante est beaucoup plus apparente que réelle, car elle correspond à une série de phénomènes évoluant en fonction du temps avec des vitesses très variables, mais chacun d'une façon parfaitement continue. C'est en étudiant l'évolution de l'extraction des lipides en fonction du temps à chacune des diverses concentrations en alcool que nous avons pu coordonner l'ensemble des phénomènes et comprendre par exemple que les points, qui nous avaient permis de tracer la courbe obtenue après 6 heures pour des concentrations alcooliques variables, n'étaient en réalité que les points d'intersection avec un même plan de diverses courbes appartenant à une famille de courbes très homogènes et parfaitement continue.

Pour chaque concentration en alcool l'extraction des lipides se fait en fonction du temps d'une façon toujours comparable, mais avec des vitesses très différentes :

Pendant un temps préparatoire assez long, l'éther n'extraît les lipides qu'avec une lenteur extrême ; pendant une deuxième période, dite période active, la vitesse de l'extraction croît extrêmement rapidement et l'extraction atteint sa limite en un temps très bref et cette limite est indépendante de la teneur en alcool. Dans une troisième période, la période finale de l'extraction, l'éther n'extraît plus rien.

La période préparatoire varie dans de très larges limites en fonction de la concentration alcoolique mais pendant cette période la quantité de lipides passés dans l'éther est toujours extrêmement faible.

Lorsque nous avons, au début de notre travail, étudié la quantité de lipides extraits en 6 heures en présence de quantités variables d'alcool, le seuil d'extraction brusque que nous avons constaté correspondait simplement à la concentration alcoolique pour laquelle le temps de 6 heures était suffisant pour que soit terminée la période préparatoire de l'extraction.

Discussion des résultats.

Les courbes d'extraction en fonction de la durée montrent que, pendant longtemps, l'alcool n'intervient que très peu sur l'extraction éthérée et que l'extraction se fait très rapidement dans une

deuxième période, pour aboutir en peu de temps à son terme. La courbe ressemble beaucoup à la courbe représentative d'un phénomène d'autocatalyse et il n'est pas illogique de supposer que c'est l'enlèvement des quelques molécules de graisses extraites dans la première période de l'extraction qui, en troublant un équilibre, provoque l'extraction et la fait entrer dans la deuxième période d'extraction rapide. La pente des courbes dans la deuxième période de l'extraction est d'ailleurs la même pour les différentes concentrations alcooliques ; l'extraction rapide ne dépend donc pas de la concentration alcoolique, c'est un phénomène qui doit, une fois déclenché, évoluer indépendamment des conditions extérieures. Cette supposition est encore confirmée par le fait que la limite d'extraction est toujours la même quelle que soit la concentration alcoolique.

L'extraction lente de la faible quantité de graisses sous l'effet combiné de l'alcool et de l'éther a donc produit un changement dans la constitution du système et ce changement a provoqué le déclenchement de l'extraction éthérée rapide d'une proportion notable des graisses du sérum.

En nous basant sur ces faits nous avons à choisir entre deux hypothèses sur la nature des liaisons lipoprotéidiques du sérum : hypothèse chimique et hypothèse physique.

Il pourrait s'agir en effet de l'alcoolyse lente de liaisons chimiques lipoprotéidiques avec mise en liberté de graisses. Cette alcoolyse pourrait se faire encore à la rigueur avec un seuil de concentration et pourrait n'intéresser que certains groupements lipoprotéidiques, les molécules de graisses extraites pourraient également activer l'extraction par l'influence des covalences libérées.

Toutes ces suppositions sont très peu probables. Il faudrait admettre que des fonctions amines ou alcools ont une influence capitale sur des fonctions esters ou osides plus ou moins lointaines, il faudrait admettre que cette catalyse chimique se fait indépendamment de la concentration alcoolique du milieu. Nous adoptons plus volontiers une représentation physique, mais nous devons mentionner que la distinction entre une hypothèse chimique et une hypothèse physique reste toujours délicate (1).

(1) Ce même problème se pose tous les jours dans la chimie dynamique de la vie. Je ne veux pas entrer dans des considérations par trop philoso-

Nous avons cherché à donner au phénomène une représentation physique rendant bien compte des faits observés :

Le système lipoprotéidique du sérum serait un système micellaire équilibré par l'orientation polaire des molécules qui le composent. Cette orientation moléculaire condenserait à la surface micellaire les fonctions polaires hydrophiles des molécules, tandis que les fonctions apolaires, hydrophobes et paraffines, seraient réunies et cachées à l'intérieur des micelles.

Dans le cas de molécules complexes, à longue chaîne, les aptitudes de solubilité des différentes parties de ces molécules peuvent être différentes. L'éther en particulier est un solvant des fonctions paraffines, tandis que les fonctions polaires, hydratées sont insolubles dans l'éther. L'inextractibilité des graisses par l'éther pourrait ainsi être due à l'inaccessibilité des fonctions paraffines réunies à l'intérieur des micelles lipoprotéidiques. L'alcool en présence d'éther produirait un changement qui rendrait l'intérieur des micelles tout au moins partiellement accessibles aux solvants des graisses. Ce changement serait essentiellement un changement physique, une perturbation d'un équilibre physique, une dépolarisation momentanée.

L'idée de l'existence d'un équilibre physique particulier dans le système lipoprotéidique du sérum vient du caractère brusque et quantique du changement qui semble produire l'extraction ; cette idée est d'ailleurs corroborée par d'autres faits que nous avons déjà énumérés (voir pages 116, 117). Le changement rapide auquel est lié l'extraction semble être introduit par l'extraction lente de quelques molécules de graisses du système lipoprotéidique ; cette extraction lente enfin est liée à la présence simultanée d'alcool et d'éther. Les faits se groupent ainsi dans le temps en un ensemble logique. Dans la structure physique, équilibrée des micelles lipoprotéidiques chaque constituant molé-

phiques, mais je voudrais simplement souligner combien cette distinction est délicate. Dans l'état cristallin par exemple on admet que les atomes ou les molécules sont liés par des forces physiques, mais nous savons actuellement que la valence des éléments est profondément perturbée dans les états cristallins — il faudrait donc supposer que les tautoméries électroniques définissent des différences physiques et ceci est absurde. La plupart des différences physiques se réduisent à des tautoméries électroniques (allotropie des éléments, formes cristallines, etc.), elles constituent donc des vraies différences chimiques.

culaire joue un rôle, comme toutes les unités d'une construction statique sont équilibrées par les autres unités et les équilibrent en même temps. L'alcool diminue l'hydratation des micelles et permet à l'éther d'extraire quelques molécules de lipides qui étaient des piliers dans la construction des micelles, l'équilibre est ainsi ébranlé et à un moment donné un brusque déséquilibre survient. Les molécules se dépolarisent brusquement et rendent l'intérieur des micelles tout au moins partiellement accessibles à l'éther.

L'étude de l'extraction alcoolo-éthérée du sérum nous a donné à nouveau l'idée de l'existence d'un système stable, équilibré dans le sérum. Nous allons maintenant chercher à préciser cette notion.

***Sur la nature des forces qui interviennent
dans la constitution des complexes lipoprotéidiques
et protéidoprotéidiques.***

En nous basant sur ces notions nous pouvons maintenant proposer une image de la constitution des complexes lipoprotéidiques. Avant tout, nous essayerons de donner une hypothèse concernant la nature des forces qui interviennent dans la constitution de ces complexes. Cette hypothèse tient compte des notions actuelles sur les forces qui interviennent dans la constitution de la matière. Il est à noter d'ailleurs que ces notions subissent actuellement une évolution et l'hypothèse que nous avançons devra peut-être être modifiée d'ici peu. Les hypothèses doivent d'ailleurs n'avoir d'autres prétentions que d'être en accord avec les faits expérimentaux, de grouper ces faits et de faciliter ainsi l'orientation des recherches.

Nous n'avons pas l'intention de passer en revue toute l'évolution historique et toutes les discussions théoriques sur les valences chimiques et sur les forces physiques. Ces discussions trouvent leur place dans les traités classiques de physique. Nous en résumerons brièvement l'essentiel sur la valence secondaire de WERNER et sur la valence secondaire dans l'idée de LANGMUIR. La représentation que nous avançons concernant la structure des systèmes lipoprotéidiques suivra ce bref résumé.

Discussions sur les forces chimiques et les forces physiques.

Nos connaissances sur les solutions subissent actuellement des remaniements profonds. L'assimilation mécanique du corps dissous aux molécules gazeuses selon l'idée de Van't'Hoff, était grossièrement fausse, elle a donné naissance à des lois thermodynamiques inexactes. La théorie d'hydratation introduite par PAULI, la notion thermodynamique de fluidité exposée par LEWIS, modifient lentement notre représentation de l'état des corps dissous et font accorder une grande importance à l'étude des relations entre solvant et corps dissous.

Nos idées évoluent également en ce qui concerne le dynamisme des propriétés physiques des corps. L'analyse des cristaux par les rayons X (LAUE, BRAGG) démontre la généralité d'intervention de certaines forces, les valences secondaires de WERNER, dans la constitution de la matière à l'état solide.

Théorie de WERNER.

WERNER (1) lui-même ne voulait démontrer que l'insuffisance de la notion classique de valence chimique. La valence remplaçait alors l'ancienne notion de l'équivalence. Pour la définir, on considérait donc les rapports de masse dans lesquels les différents éléments s'unissent pour former des espèces chimiques. On peut en donner une deuxième définition plus facilement accessible à l'expérience. Cette définition est basée sur la loi de Faraday, la valence (électrovalence) nous apparaît comme l'équivalent électrochimique des éléments, c'est-à-dire le poids atomique de l'élément divisé par la quantité de cet élément qui porte l'unité de la charge. L'unité de charge est la quantité d'électricité qui dépose un atome-gramme d'argent (2).

Il était classique de considérer la valence comme un nombre invariable que l'on retrouve toujours le même dans les composés chimiques d'un élément. On savait cependant que la valence élec-

(1) A. WERNER, *Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie*, Braunschweig, 2^e édition, 1909.

(2) C'est d'ailleurs cette notion qui a donné naissance à la théorie électronique de la valence.

trochimique de certains éléments peut subir des changements (Fe, Mn, Cu, Hg, etc.).

Werner s'applique à démontrer la variabilité extrême de la valence des éléments en général. Il considère la valence des éléments comme un ensemble d'énergie qui peut être divisé entre des nombres variables d'éléments ou radicaux, ces nombres dépendent de la nature des radicaux qui entrent en réaction et des conditions autres de l'ambiance (1). Pour Werner donc, il n'y a aucune règle générale permettant de prévoir le nombre des éléments qui peuvent s'unir à un élément considéré.

Il nous semble cependant qu'une conclusion aussi pessimiste est peut-être exagérée. On peut toutefois tirer comme conclusion de ces travaux qu'à côté de leur valence principale (valence primaire) la plupart des éléments peuvent subir dans certaines conditions des changements dans leurs valences et ces changements révéleront pour nous l'existence de valences supplémentaires (valences secondaires). L'ensemble des valences primaires et des valences secondaires donnera la valence maximale d'un élément. Cette valence maximale, appelée parfois nombre de coordination, est le plus souvent un nombre complètement indépendant de la valence électrochimique de l'élément considéré et se retrouve identique pour un grand nombre d'éléments appartenant aux groupes les plus éloignés de la série de Mendeleïff; la valence maximale est le plus souvent égale à 6. Le nombre de coordination nous apparaît ainsi comme correspondant aux nécessités géométriques de saturation des forces et nous le retrouvons en effet le plus souvent comme étant à la base de la constitution des cristaux. Il peut cependant intervenir exclusivement dans la formation de certains complexes et caractériser autant les aptitudes réactionnelles de certains éléments que la valence classique carac-

(1) A. WERNER, *Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie*. En particulier l'auteur écrit (page 25) : Die Wertigkeit ist ein Zahlenbegriff, der die Verbindungsverhältnisse der Elemente zusammenfasst. Sie ist keine den Atomen als solchen zukommende Eigenschaft, sondern von der Natur der sich verbindenden Elementaratomen und den herrschenden physikalischen Bedingungen abhängig » et page 81 : « Die Affinität ist eine vom Zentrum des Atoms gleichmässig nach allen Teilen seiner Kugeloberfläche wirkende, anziehende Kraft. Aus dieser Auffassung der Affinität folgt notwendig, dass gesonderte Valenzeinheiten nicht bestehen ».

térise celles de certains autres. Les séries werneriennes dans les composés du cobalt ou du platine illustrent cette notion.

L'étude des corps par les rayons X a fourni la démonstration de deux faits :

a) les corps solides ont souvent une structure cristalline sans présenter de formation cristalline macroscopique ;

b) le plus souvent dans les solides cristallins les atomes sont disposés dans l'espace d'une façon incompatible avec la notion classique des valences.

Ainsi les idées de WERNER ont permis un premier rapprochement entre les forces physiques (construction des corps solides) et les forces chimiques (construction de nombreuses espèces chimiques).

Théorie de LANGMUIR.

Ces faits constituent le point de départ des recherches de LANGMUIR (1). Dans une première série d'expériences, cet auteur étudie le comportement des surfaces métalliques à des températures variables en présence d'atmosphères gazeuses différentes. D'autres expériences concernent les propriétés des surfaces de séparation entre deux phases liquides ou entre une phase liquide et une phase gazeuse. Nous pouvons résumer son exposé comme suit :

On a l'habitude d'appeler « forces physiques » les forces dont l'intensité décroît en rapport inverse des carrés des distances et dont le rayon d'action dépasse en tout cas largement les diamètres atomiques et moléculaires. Nos connaissances sont encore insuffisantes sur la nature des forces qui interviennent dans la constitution de la matière, soit du point de vue chimique (formation d'agrégats atomiques), soit du point de vue physique (états gazeux, liquide, solide et dissous). C'est ainsi que les conceptions de l'atome de RUTHERFORD ou de la valence de LEWIS font entrer en jeu des attractions électriques pour expliquer les manifestations interatomiques. Ces conceptions ne rendent cependant aucunement compte de la force de répulsion qui naît entre

(1) I. LANGMUIR. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 2221 (1916).

les atomes ou entre l'électron et le noyau atomique et qui remplace entre les unités matérielles suffisamment rapprochées l'attraction électrostatique obéissant à la loi de COULOMB. Cette ignorance fait que la distinction entre force physique et force chimique est loin d'être aisée. Ce qui est encore le plus net et le plus facile à contrôler par l'expérimentation, c'est la dimension du champ d'action des forces. Il est évident que, si ces champs de force ne dépassent pas les sphères de rayon du diamètre interatomique, une saturation interatomique de ces forces sera possible. Il sera d'ailleurs logique d'appeler chimiques les forces qui seaturent entre des atomes individuels et qui ainsi ne dépassent pas les sphères d'action des atomes. Le démembrement de ces forces dans l'état actuel de nos connaissances sera en effet toujours plus ou moins artificiel (1).

En se basant sur l'étude des divers processus physiques (sublimation, condensation, adsorption, tension superficielle), LANGMUIR démontre que les forces qui déterminent ces réactions, ne dépassent pas les diamètres interatomiques et qu'elles sont souvent douées dans leurs manifestations d'une spécificité de même ordre que celle qui caractérise les réactions de la chimie classique. La spécificité et les dimensions des champs d'action permettent de dire que les forces qui interviennent dans la constitution physique de la matière sont le plus souvent des forces chimiques. Les forces physiques à proprement parler n'interviendraient que dans la constitution de certains systèmes théoriques, gaz parfait par exemple.

Cependant les faits nécessitent quand même le démembrement des forces chimiques en deux classes. La valence électrochimique des éléments (dont une belle représentation se trouve dans l'atome de RUTHERFORD, le numéro atomique et la série de MENDELEJEFF) se trouve conservée dans de nombreuses combinaisons de la chimie classique. Il y a une valence primaire des éléments qui correspond vraisemblablement à la tendance spéciale des électrons périphériques des atomes à former des doublets électro-

(1) Ce raisonnement simple qui ne préjuge en rien de la dynamique des processus, conserve sa pleine valeur encore actuellement. Les théories électrostatiques et la mécanique des ondulations n'ont apporté que des controverses sur ce sujet. La question de dynamique n'a pour le moment sa place que dans les discussions de la physique théorique.

ques ou des ensembles de 8 électrons. Mais à la surface des atomes ainsi saturés dans leur valence primaire, dans les agrégats atomiques que sont les molécules chimiques, il persisterait des champs de forces qui amèneraient des attractions mutuelles entre les atomes des différentes molécules. Ce sont les valences secondaires que l'on peut assimiler à des valences chimiques parce qu'elles sont spécifiques et parce qu'elles ont un rayon d'action de l'ordre du diamètre interatomique. L'état liquide, l'état solide, la dissolution, l'évaporation, la condensation sont déterminés par ces forces.

*
**

La théorie de LANGMUIR était somme toute une généralisation de la théorie de WERNER ; une différence fondamentale sépare cependant le raisonnement des deux auteurs. La valence secondaire de WERNER était et doit rester une valence chimique et la valence chimique doit rester une notion simple de la pratique chimique. C'est un nombre qui divise les poids atomiques et qui caractérise les quantités dans lesquelles les éléments peuvent se réunir pour former des composés définis. L'atome de RUTHERFORD, la série de MENDELEJEFF et la théorie électronique de la valence sont des théories, elles n'ont donc de valeur qu'autant qu'elles sont en accord avec les faits expérimentaux. La valence de WERNER caractérise un équivalent chimique comme n'importe quelle valence et elle prouve simplement que les théories précédentes sont insuffisantes.

Nous ne nous sentons pas qualifiés pour juger si un rapprochement entre la théorie électronique de la valence et la théorie de WERNER est possible, ce rapprochement a été en tout cas tenté. Nous voulons parler des travaux de SIDGWICK (1) qui tendent à situer les valences werneriennes parmi les valences électroniques. D'après cet auteur, les quanta électrochimiques ne seraient pas immuables pour un élément, ils pourraient subir des variations ; ces variations ne seraient d'ailleurs pas quelconques, elles suivraient certaines règles et les valences wernerien-

(1) N. V. SIDGWICK, *Electronic Theory of Valency*, Oxford, 1927 *Ztschr. f. Elektrochem.*, **34**, 445 (1928).

nes deviendraient ainsi des caractéristiques bien déterminées des groupes d'éléments dans la série de MENDELEJEFF (1).

Il serait inexact d'identifier la valence secondaire de LANGMUIR à la valence de coordination de WERNER. Jusqu'à nouvel ordre, les forces qui déterminent l'adsorption, la dissolution, etc., n'aboutissent pas à la réunion d'éléments en quantités bien déterminées, multiples simples d'une quantité fondamentale. Que le vrai dynamisme de ces forces réside dans des réactions chimiques classiques, dans des réarrangements électroniques, sortes de tautométrie, ou dans des attractions supplémentaires émanant des atomes chimiquement saturés, peu importe, pour nous ce sont les faits expérimentaux qui comptent.

La déduction de LANGMUIR définit ainsi une valence secondaire particulière et c'est cette valence qui détermine les phénomènes spécifiques de dissolution et d'adsorption. Cette valence découle peut-être de l'action de forces de natures différentes, mais ces forces restent dans leur résultat des valences physiques : valence de dissolution, valence d'adsorption. Les propriétés de ces forces définies par LANGMUIR, sont très utiles pour expliquer un grand nombre de manifestations du domaine biologique et du domaine physico-chimique. Les caractères essentiels de ces forces sont en effet : 1. de pouvoir se faire valoir même entre des corps chimiquement inactifs ; 2. d'être douées de spécificité et de pouvoir manifester cette spécificité entre certains groupements atomiques d'une molécule complexe. Les aptitudes de dissolution et les aptitudes d'adsorption d'une molécule peuvent ainsi être déterminées d'une façon spécifique par certains atomes de cette molécule et nous allons voir combien ce principe peut être fécond dans l'explication de la structure physico-chimique et des propriétés des colloïdes biologiques.

Les caractères de la valence secondaire de LANGMUIR furent retrouvés de nombreuses fois par d'autres auteurs. On a vu en particulier que les forces qui interviennent dans les phénomènes de cohésion, telle la coagulation, ont des sphères d'action extrê-

(1) Il est peut-être important de noter que les éléments appartenant au premier cycle de MENDELEJEFF, les éléments les plus légers, auxquels appartient le carbone, semblent être en général inaptes à subir des augmentations de valence. Les valences de coordination concernent en général les éléments à poids atomique élevé.

mement petites (1). Ce sont parfois, mais rarement, des forces chimiques vraies, comme dans le cas de l'adsorption de l'hydrogène par le palladium colloïdal (2), mais elles s'appliquent très souvent à des corps absolument inactifs du point de vue chimique. Le charbon activé adsorbe, semble-t-il, les gaz rares en couche monomoléculaire (3) et ceci tend à prouver que la force, qui se fait valoir entre deux corps réputés inactifs du point de vue chimique, peut, elle aussi, aboutir à une saturation interatomique.

Applications aux phénomènes spécifiques de la dissolution.

Ces faits trouvent une application très intéressante dans le sujet qui nous intéresse. Dans le cas spécial de la dissolution, un principe particulier est en effet souvent à la base de la spécificité des faits physiques. Dans le cas de la plupart des solvants organiques, la ressemblance régit la miscibilité ; ce fait est bien démontré dans les exemples de HARKINS (4). Ce principe était d'ailleurs déjà connu au temps des alchimistes : *Les semblants se dissolvent*. A ce fait correspond naturellement une expression thermodynamique qui s'applique très bien à ce qui se passe à la surface de séparation des liquides. A ce niveau, les molécules se disposeront de façon que l'énergie libre soit au minimum, c'est-à-dire que la transition soit moins brusque (5). Comme toujours,

(1) ZSIGMONDY, *Kolloidchemie I*, page 188. A. WESTGREN et J. REISTOETTER, *Ztschr. f. physik. Chem.*, **92**, 750 (1918).

(2) MM. BOURGUEL, *Bull. Soc. Chim.*, **51**, 253 (1932).

(3) C. SCHUSTER, *Ztschr. physik. Chem. (B)*, **14**, 249 (1931).

(4) W. D. HARKINS, *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 541 (1917).

(5) C'est d'ailleurs sur ce point que l'exposé de HARKINS diffère essentiellement de celui de LANGMUIR. LANGMUIR ne prend la surface de séparation entre deux phases différentes que comme un cas typique, facilement accessible à l'expérience. Le fait de surface n'introduit pour lui aucune différence qualitative. La surface porte pour LANGMUIR les mêmes forces que l'intérieur des phases, seulement la manifestation des forces est ici plus accessible. Pour HARKINS par contre la surface introduit une déformation dans le champ de forces des atomes et fait naître de nouvelles dimensions à ces forces en intensifiant ce champ de force et en le déformant. La généralisation de LANGMUIR est très utile pour la compréhension de l'en-

la base des lois thermodynamiques repose sur des principes mécaniques et le naturaliste recherchera toujours une certaine correspondance de forme à la base des phénomènes spécifiques de la dissolution (1). L'énergie libre est au minimum quand le mélange s'effectue entre des formes correspondantes.

Pour la plupart des réactions chimiques, un principe contraire semble exister : une saturation de forces électriques de signes contraires entre des éléments les plus différents. C'est surtout l'apanage des réactions entre acides et bases et, en chimie organique, des fonctions contenant de l'oxygène, de l'azote et du soufre. LEWIS (2) cherche une explication dans la théorie électronique de la valence et appelle *groupements polaires* les unions interatomiques où il y aurait un vrai transfert électronique de l'élément électropositif pour compléter à huit les électrons périphériques de l'élément électronégatif. Le transfert électronique donnerait les caractères de corps électriquement chargés à ces molécules et expliquerait en particulier leur tendance à l'ionisation. Les groupements polaires doivent être distingués des groupements apolaires dont le type est fourni par la fonction carbure d'hydrogène saturé. Dans ce cas là liaison chimique prendrait naissance dans une mise en commun d'électrons entre les deux atomes entrant en réaction sans que le signe électrique des éléments se fasse valoir. Les molécules obtenues par liaisons apolaires sont électriquement neutres.

Les valences résiduelles (valences de LANGMUIR) provoquent des réactions qui ressemblent à celles qui sont produites par des

semble des faits. Le fait de l'organisation en couche monomoléculaire orientée restera d'ailleurs toujours une preuve du principe de LANGMUIR : La sphère d'action très réduite des forces qui interviennent dans la dissolution, dont le rayon ne dépasse pas le diamètre interatomique et qui permet ainsi une saturation interatomique. Dans le cas des solutions aqueuses des protéides, vu la dispersion extrême, la surface : carbure d'hydrogène-eau, peut jouer un rôle en exagérant la valeur de la force de dissolution entre deux fonctions carbures.

(1) Les lois thermodynamiques sont basées sur des vérités statistiques. Les affinités et les constantes d'équilibre expriment cependant des augmentations de probabilité de la production de certaines unions. Ce favoritisme porte la qualité des événements : les spécificités, et, pour l'esprit humain qui a tendance à concrétiser, ces spécificités resteront des vérités mécaniques : des correspondances de formes.

(2) LEWIS, *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **35**, 1448 (1913) et **38**, 762 (1916).

valences apolaires : elles ne seaturent qu'entre des molécules ou des radicaux ressemblants. En particulier les solvants polaires : l'eau, l'ammoniaque liquide, etc., dissolvent des molécules polaires tandis que les solvants apolaires, tels que les carbures d'hydrogène, dissolvent des molécules non polaires (1).

(1) La miscibilité entre deux liquides et la dissolution d'un solide dans un liquide ne sont pas toujours comparables. Surtout dans la dissolution entre groupements polaires avec formation d'ions libres, des phénomènes électrostatiques puissants pourraient peut-être jouer un rôle important. Ces phénomènes électrostatiques sont des cas relativement simples et trouvent aujourd'hui une application très étendue dans l'explication des propriétés des solutions (consultez en particulier les différents travaux de DEBYE, *Physik. Ztschr.*, **24** (1923), **25** (1924), *Ztschr. f. Electrochem.*, **34**, 450 (1928)). Remarquons qu'actuellement la mécanique des ondulations aboutit à des résultats rendant la valeur de ces explications discutable (F. LONDON, *Ztschr. f. physik. Chem. (B)*, **11**, 222 (1931), K. WOHL, *Ztschr. f. physik. Chem., Jubilé Bodenstein*, 807 (1931)). L'observation de LANGMUIR paraît se vérifier même du point de vue théorique ; l'application des lois grossières de l'électrostatique ou de la gravitation sur les interactions atomiques ou moléculaires doit toujours être faite avec une grande réserve.

CHAPITRE III

HYPOTHÈSE SUR LA STRUCTURE DES MICELLES LIPOPROTÉIDIQUES

HARKINS étudiant ce qui se passe au niveau où sont en contact deux liquides ou deux phases quelconques, émit l'hypothèse suivante : les molécules à la surface de séparation de deux phases doivent être polarisées de façon à ce que la transition de l'une des phases dans l'autre soit le moins abrupte possible. Cette orientation est une nécessité physique quasi absolue et se déduit directement du deuxième principe de la thermodynamique dont l'une des expressions non mathématique est : chaque système tend spontanément vers un état où l'énergie libre est au minimum. Un composé organique satisfait à ce principe lorsqu'il oriente son ou ses groupements polaires vers la phase aqueuse.

Considérons maintenant le système constitué par les protéides naturels dispersés dans l'eau. Tous les travaux tendent à les considérer comme formés de polypeptides réunis par des forces de valence résiduelle ; entre ces polypeptides ou autour d'eux se placent des molécules de lipides. Nous pouvons tout d'abord supposer que les constituants des micelles lipoprotéidiques ont une orientation spéciale lorsque les micelles sont en dispersion dans l'eau. Pour un système aussi complexe qu'une micelle lipoprotéidique on peut en effet compter avec une surface de séparation et on peut supposer que, dès leur naissance, les particules ont reçu une constitution particulière par l'orientation des molécules (chaînes de valence primaire) qui les constituent. Les groupements polaires s'orientent partout vers les molécules d'eau et stabilisent ainsi le système ; les groupements carbures d'hydrogène s'orientent loin de l'eau et se réunissent ensemble dans l'intérieur des micelles ; par l'effet électrostatique des groupements ionisés carboxyle et amine, des atmosphères d'eau de

densité plus élevée et de propriétés spéciales entourent par place la surface micellaire et contribuent encore à augmenter sa stabilité.

En ce qui concerne la structure intérieure de ces micelles, nous admettons que les polypeptides sont unis ensemble et s'unissent aux molécules de lipides par des forces de valence secondaire ; cette valence secondaire doit être comprise suivant l'idée de LANGMUIR. La valence résiduelle ou valence de dissolution doit affecter principalement, dans les conditions humorales et cellulaires, les fonctions carbures d'hydrogène saturés, qui sont dans un état de contrainte physique énorme lorsqu'elles sont en dispersion dans l'eau. Ces fonctions peuvent ainsi jouer un rôle primordial dans les unions dont résultent les complexes colloïdaux des humeurs.

Tout ce système a encore un ensemble de propriétés que nous avons caractérisé comme une rigidité de constitution (voir pages 116 et 117). Nous supposons que les micelles, telles qu'elles se détachent des cellules, ont un équilibre physique particulier. La rigidité de constitution résulterait de cet équilibre physique qui se rapprocherait par certains caractères d'une structure cristalline (1). Cette structure *pseudo-cristalline* prendrait naissance au cours de la synthèse des micelles à l'intérieur des cellules et serait conditionnée par la configuration moléculaire des constituants élémentaires (polypeptides et lipides qui forment les chaînes de valence primaire). La naissance d'un cristal est, en effet, liée d'une façon spécifique à la structure des atomes et des molécules qui le constituent ; cette spécificité est d'ordre géométrique et suppose une correspondance de forme des constituants de l'élément cristallin. L'union des chaînes de valence primaire dans la construction des micelles des colloïdes biologiques ne serait donc pas hasardeuse, elle se ferait entre des molécules de nature bien déterminée. L'empêchement stérique (2) a des exemples bien nets en chimie organique, en parti-

(1) Nos idées ont reçu une confirmation directe dans le cas de la gélatine (voir page 124).

(2) Le terme « empêchement stérique » se rapporte sur les faits observés au cours de la saponification des différents esters par les acides organiques. Les vitesses de saponification sont en effet extrêmement variables d'un ester à l'autre et ces différences semblent dépendre des conditions stériques offertes par les différents radicaux.

culier dans la chimie des esters, ce même terme pourrait être appliqué au principe directeur de la sélection dans les unions des chaînes de valence primaire dans les colloïdes biologiques.

Cette représentation réunit deux idées paraissant très différentes : la structure pseudo-cristalline ou rigidité de constitution et la nature chimique bien déterminée des constituants élémentaires. Ces deux idées sont cependant liées. La micelle ne devient rigide que parce que les chaînes de valence primaire qui la composent se peuvent disposer dans l'espace suivant une configuration optimale. A côté de la nature chimique des constituants, l'union optimale pourrait dépendre aussi des conditions extérieures ; ces conditions sont les conditions physico-chimiques qui règnent dans le protoplasma et sur ce point malheureusement nous sommes très mal renseignés.

Sur le problème de la réversibilité.

Un problème d'une importance capitale est la question de la réversibilité des dissociations de ces dissolutions mutuelles de molécules. La solution du problème n'est pas donnée par la nature même de ces unions. En effet ces systèmes, dans l'état où l'expérimentation les atteint, peuvent être aussi bien dans un équilibre stable que dans un faux équilibre. C'est l'expérimentation seule qui peut résoudre le problème. Les systèmes équilibrés dans leurs valences résiduelles ont souvent, si l'on peut s'exprimer ainsi, la même rigidité d'état qu'ont les composés chimiques formés par des valences primaires. Nous n'avons qu'à considérer les phénomènes de surfusion, sursaturation, surchauffe et l'absence d'efflorescence des cristaux parfaits, sans plans de cassure, qui permet de les conserver sans changement dans un état de faux équilibre pendant des années.

Les protéides naturels des humeurs sont vraisemblablement formés à l'intérieur des cellules où les conditions thermodynamiques sont foncièrement différentes (autre réaction du milieu, concentration différente en constituants organiques, etc.). En passant dans les humeurs, ils peuvent conserver réunis des groupements liés par des valences résiduelles qui ne sont pourtant plus dans un équilibre stable dans les nouvelles conditions. Ceci est

presque certainement le cas pour les complexes lipoprotéidiques, lesquels n'ont jamais pu être fabriqués à partir des constituants séparés, mais ceci peut être aussi le cas pour certains complexes protéido-protéidiques. Les expériences de SVEDBERG et SJØERGEN (1) semblent prouver l'existence de changements irréversibles dans le système « globuline », changements irréversibles se faisant dans le sens de la dissociation sous l'effet du sulfate d'ammonium. Nous ne pensons d'ailleurs pas qu'il soit nécessaire d'admettre des changements chimiques vrais, hydrolytiques ou autres, lorsqu'il s'agit de changements irréversibles.

Actuellement encore, nous ne connaissons pas des constantes physiques bien nettes qui pourraient caractériser avec une exactitude suffisante des protéides naturels; le plus souvent nous sommes obligés de recourir à des méthodes indirectes. Pour le système « globuline » par exemple les caractéristiques sont des propriétés de solubilité purement qualitatives : solubilité dans les solutions salines diluées (euglobulines) ou solubilité dans l'eau distillée (pseudoglobulines). Naturellement, la conservation de ces propriétés prouve l'absence de dénaturation, mais d'autres changements, tels que des dissociations irréversibles, peuvent donner naissance à un matériel neuf présentant exactement les mêmes propriétés qualitatives de solubilité que le matériel primitif.

Nous ne pouvons avancer aucune hypothèse concernant la forme des particules protéidiques dispersées dans l'eau, le nombre des constituants individuels et le poids moléculaire de ces constituants. Les résultats chimiques semblent prouver qu'un grand nombre de constituants individuels prend part à la constitution de ces micelles. En se basant sur les travaux de SVEDBERG et de ses collaborateurs (voir pages 29 et 30) on pourrait attribuer à un grand nombre de protéides naturels : protéides du sérum, ovalbumine, hémoglobine, etc., une constitution semblable. Cet auteur trouve que le poids moléculaire de ces particules est 35.000 ou un multiple simple de ce chiffre. Le poids moléculaire des polypeptides individuels doit cependant être bien inférieur à ce chiffre. De différentes manières et par exemple par une simple dilution du système, SVEDBERG obtient des fractions que l'on

(1) SVEDBERG et SJØERGEN, *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 2855 (1930).

ne peut plus faire se déposer par ultracentrifugation. Ces fractions ont donc un poids moléculaire inférieur de beaucoup à 35.000.

Résumé et rappel des conclusions du présent chapitre.

Dans le présent chapitre, nous avons émis une hypothèse sur la constitution des micelles lipoprotéidiques du sérum; nous avons défini ces micelles comme ayant une structure physique particulière qui serait caractérisée par une rigidité de constitution, une structure pseudo-cristalline. Les travaux récents sur les propriétés physico-chimiques des protéides démontrent que les protéides naturels sont des systèmes complexes constitués par l'union de plusieurs espèces chimiques. Nous avons réuni des preuves en faveur d'une certaine stabilité de ces unions et nous avons admis, d'autre part, que la structure de l'ensemble du système était douée d'une certaine rigidité. Cette supposition s'appuie surtout sur les résultats obtenus dans nos expériences sur l'extraction étherée du sérum en présence de faibles quantités d'alcool.

Les forces qui interviennent dans la constitution des micelles lipoprotéidiques prendraient leur origine dans des valences secondaires. Ces valences secondaires appartiendraient au groupe des valences définies par LANGMUIR; le type de ces valences est la valence de dissolution qui préside aux phénomènes spécifiques observés dans l'étude de la solubilité des corps. Dans les conditions humérales les fonctions « carbure d'hydrogène saturé » pourraient être particulièrement affectées par les manifestations de ces valences et nous faisons ainsi jouer à ces fonctions, contenues dans les molécules de polypeptides et de lipides qui constituent les micelles lipoprotéidiques, un grand rôle dans la constitution de nos systèmes complexes.

CINQUIÈME PARTIE

CONCLUSIONS

CHAPITRE PREMIER

CONCLUSIONS D'ORDRE PRATIQUE

Nous voudrions insister sur certaines conclusions d'ordre pratique résultant de notre exposé. De tous les faits précités il découle que le système lipoprotéidique « albumine » et le système lipoprotéidique « globuline » ont une signification très nette. Nous avons résumé précédemment toutes les preuves pour la signification physique de ces termes (pages 116 à 118). « Globuline » et « albumine » ne sont pas des espèces chimiques, mais paraissent être deux micelles foncièrement différentes et bien caractérisées (1). Ces deux systèmes doivent avoir une certaine rigidité de constitution qui leur donne une valeur chimique. Leur rapport quantitatif réciproque (rapport albumine sur globuline) et les rapports lipoprotéidiques gardent une importance capitale en pathologie et en physiologie. Ces deux systèmes sont dans un état d'équilibre qui persiste presque indéfiniment en l'absence d'intervention extérieure. Par contre, ces systèmes semblent être assez labiles vis-à-vis des changements des conditions extérieures. Comme ensembles extrêmement complexes, ils semblent, une fois fragmentés, subir des évolutions irrégulières (2).

(1) Il n'est pas impossible que chacune de ces fractions soit un ensemble de plusieurs micelles différentes — dans ce cas cependant les différentes micelles appartenant à un même type doivent se ressembler beaucoup entre elles et chacune d'elles doit différer beaucoup de n'importe quelle micelle appartenant à l'autre type.

(2) Ces faits peuvent être expliqués si l'on suppose un grand nombre de constituants différents dans une même micelle qui donne la possibilité pour un grand nombre d'évolutions différentes; l'état de faux équilibre dans lequel se trouve vraisemblablement la micelle lipoprotéidique primitive du sérum pourrait aussi contribuer à permettre des évolutions hasardeuses du système. Les évolutions d'un système métastable peuvent en effet s'arrêter à des états intermédiaires variables parce que l'évolution du système peut subir des fluctuations.

C'est un état d'équilibre particulier qui définit ces systèmes complexes comme des unités chimiques et nous avons cherché à déterminer la nature de cet état d'équilibre. Si l'équilibre est détruit, on se trouve en présence d'un mélange d'une complexité désespérante qui subit des dissociations et des réunions variables. Ces évolutions paraissent se faire d'une façon extrêmement variable, pour une espèce donnée, d'un individu à l'autre ou d'un état physiologique à l'autre.

L'euglobuline et la pseudoglobuline ont des définitions insuffisantes, plusieurs fractions des globulines du sérum ont reçu en effet ces mêmes désignations : euglobuline et pseudoglobuline obtenues par précipitation saline, euglobuline et pseudoglobuline de dialyse, euglobuline et pseudoglobuline obtenues par dilution et acidification ; ces différentes fractions ne sont nullement correspondantes. Ces fractions sont d'ailleurs obtenues par des fractionnements basés sur des propriétés physiques de valeur discutable. Pour illustrer ces faits, rappelons les résultats obtenus ci-dessus sur les sérums de chevaux normaux traités tous exactement de la même façon ; ces essais montrent que la teneur relative des globulines en euglobulines et pseudoglobulines est extrêmement variable, même dans les conditions physiologiques.

Jusqu'à nouvel ordre, nous ne conseillons pas de baser des conclusions physiologiques ou pathologiques sur des résultats obtenus par le dosage des fractions de la globuline totale ou de l'albumine totale des sérums. La globuline et l'albumine devraient être précipitées et dosées dans leur totalité. Les définitions « albumine » et « globuline » correspondent à leur détermination par la méthode d'HOFMEISTER. Les deux fractions sont déterminées par la limite de précipitation très nette que l'on obtient dans la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Le sulfate de soude à sa température de solubilité maximale (40°) conduit aussi à cette même limite de précipitation. La dilution et l'acidification ou la dialyse ne précipitent, par contre, qu'un fragment des globulines et comme ces fragments ne paraissent pas constants, si l'on passe d'un cas à l'autre, nous ne conseillons pas l'emploi de ces méthodes de fractionnement.

Une méthode très commode est l'emploi du sulfate d'ammo-

nium en solution saturée, neutre, c'est la méthode que nous avons toujours adoptée dans nos recherches (pour la description de cette méthode voir pages 61 et suivantes). Comme micro-méthode on peut se servir de la méthode de HOWE (1) qui emploie le sulfate de soude à 40°.

(1) P. E. HOWE, *Journ. biol. Chem.*, **49**, 93 (1921).

CHAPITRE II

CONCLUSIONS D'ORDRE GÉNÉRAL

Le rôle que l'on fait jouer aux protéides en biologie est énorme. En immunologie par exemple on admet encore actuellement que les protéides naturels seuls pourraient être des antigènes vrais, des antigènes *in vivo* (1). Pour ce qui est des diastases, dont la nature chimique est encore très discutée, des preuves sérieuses en faveur de leur nature protéidique furent obtenues récemment par NORTHROP (2) et SUMMER (3). Ces auteurs ont en effet obtenu des protéides cristallisés doués de très fortes activités diastasiques.

On ne doit plus s'étonner de ces faits si l'on se reporte à nos connaissances actuelles sur la constitution des *protéides naturels* et aux conceptions que nous avons exposé dans notre travail : Un *protéide naturel* n'est pas un polypeptide, il réunit plusieurs polypeptides, plusieurs lipides et éventuellement des glucides ; un protéide cristallisé est de même constitué par tout cet ensemble complexe. Un protéide naturel nous apparaît ainsi comme une parcelle de la matière vivante qui peut réunir de nombreux constituants de la matière vivante. Il serait d'ailleurs faux de dire qu'un *protéide naturel* est une diastase ou un antigène, le protéide naturel supportera l'activité diastasique ou l'activité antigène comme il supporte les différents principes immédiats contenus dans la matière vivante. Ces activités pourraient aussi exister isolées, comme les principes immédiats peuvent eux aussi exister isolés. On arrive ainsi, en considérant sim-

(1) Voir la discussion de ce problème dans le livre de H. G. WELLS, *The Chemical Aspects of Immunity*. The Chemical Catalog Co., 1925.

(2) J. H. NORTHROP, *Journ. of Gen. Physiol.*, **13**, 739 et 767 (1930).

(3) J. B. SUMMER, *Journ. biol. Chem.*, **69**, 435 (1926).

plement la structure physico-chimique des protéides naturels, à des conclusions identiques à celles qui découlent de l'étude des activités. La notion de groupement antigène ou groupement haptène précisée par LANDSTEINER (1), la notion d'activités sans support colloïdal fixe définie surtout par WILLSTAETTER (2) sont en bon accord avec la notion de l'union de principes immédiats divers et variables en une micelle protéidique complexe.

L'importance biologique des protéides paraît ainsi singulièrement diminuée, le problème devrait être cependant posé autrement. Il faudrait étudier quel est le rôle que peut jouer la structure colloïdale particulière des colloïdes biologiques dans les activités biologiques. L'activité biologique n'est pas une propriété particulière du protéide lui-même, mais elle peut être conditionnée par un support protéidique ou tout au moins en dépendre dans certaines de ses qualités. Il en est en particulier ainsi du caractère spécifique des réactions biologiques : la spécificité des diastases, la spécificité des antigènes, qui constituent l'un des problèmes fondamentaux de la Biologie. Dans toutes ces réactions les valences résiduelles doivent jouer un rôle énorme ; WILLSTAETTER (3) réunit par exemple les diastases, les toxines et les anticorps dans un groupe spécial de substances qui seraient caractérisées par le développement particulier et le caractère spécifique que prendraient les manifestations des valences résiduelles. Notre hypothèse : la structure pseudo-cristalline des colloïdes biologiques, pourrait expliquer ces faits. La structure pseudo-cristalline est en effet particulièrement apte à développer les valences résiduelles des substances et à donner à ces valences résiduelles un caractère spécifique. La direction des forces atomiques et moléculaires devient en effet invariablement orientée dans un système doué de rigidité et ce fait donne une spécificité d'ordre géométrique aux manifestations de ces forces. La structure chimique particulière des colloïdes biologiques pourrait fournir en outre par elle-même des conditions particulièrement favorables pour le développement des valences résiduelles. Cette structure réunit en effet des fonctions carbures

(1) K. LANDSTEINER et H. LAMPL, *Biochem. Ztschr.*, **86**, 343 (1918).

(2) R. WILLSTAETTER, *Ber. chem. Ges.*, **55**, 3601 (1922).

(3) R. WILLSTAETTER, *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **55**, 3601 (1922), p. 3623.

d'hydrogène saturés et des fonctions polaires hydrophiles. Dans la dispersion aqueuse, les fonctions paraffines doivent conserver des valences résiduelles très puissantes ; la structure rigide peut, en les orientant d'une façon invariable, rendre ces valences résiduelles spécifiques.

Des réactions d'adsorption d'une spécificité très poussée constituent peut-être la base des manifestations de la vie ; une constitution pseudo-cristalline, métastable caractérise vraisemblablement la structure des colloïdes biologiques. Les activités biologiques disparaissent parfois, *in vitro*, comme par enchantement, comme une structure physique métastable peut disparaître.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION	5
------------------------	---

DEUXIÈME PARTIE

REVUE HISTORIQUE ET ÉNUMÉRATION DES FAITS ACQUIS ANTÉRIEUREMENT

CHAPITRE PREMIER. — Protéides du sérum	13
Fractionnements physiques	13
Résumé et critique des premiers travaux	20
Recherches basées sur des méthodes chimiques	24
Travaux de l'école de Sørensen	27
Travaux de The Svedberg	29
Résumé.	30
CHAPITRE II. — Caractères particuliers des graisses contenues dans la matière vivante	33
Faits histologiques	33
Faits chimiques	36
Hypothèses	37
CHAPITRE III. — Etude des lipides du sérum	47
Caractères physico-chimiques des lipides du sérum	48
Recherches sur les protéides précisant nos notions sur les lipi- des sériques.	49
Travaux de M. A. Machebœuf.	53

TROISIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER. — Système lipoprotéidique du sérum	61
Quantité de graisses entraînées avec les protéides	61
Graisses des globulines et graisses des albumines	66
Graisses des fractions secondaires.	68
Constitution des graisses des différentes fractions	74
Propriétés physico-chimiques du système lipo-protéidique	75
Résumé et rappel des conclusions	76

	Pages
CHAPITRE II. — Recherches expérimentales sur la nature et la stabilité des liaisons lipo-protéïdiques du sérum	79
Introduction	79
Extraction en fonction des quantités d'alcool	80
Question du coefficient de partage	90
Changements d'aspect et de viscosité.	93
Rapport albumine sur globuline avant et après l'extraction . .	96
Répartition des graisses extraites entre les fractions lipo-protéïdiques du sérum	98
Influence de la durée d'extraction :	
I. Sur les quantités extraites.	101
II. Sur l'aspect du sérum	108
Nature des opalescences persistantes.	110
Résumé et rappel des conclusions	112

QUATRIÈME PARTIE

INTERPRÉTATION DES FAITS ET CONCLUSIONS THÉORIQUES SUR LA NATURE DES COMPLEXES LIPO-PROTÉIDIQUES ET PROTÉIDO-PROTÉIDIQUES.

CHAPITRE PREMIER. — Résumé bref des caractères physico-chimiques des colloïdes des humeurs	115
CHAPITRE II. — Nature des forces qui interviennent dans la constitution du système	119
Quelques remarques sur le problème colloïdal.	119
Caractères particuliers des colloïdes biologiques	121
Théories physico-chimiques se rapportant à la structure des protéïdes	123
Discussion des résultats obtenus dans l'extension alcooléo-éthérée du sérum	129
Nature des forces qui interviennent dans la constitution du système	133
CHAPITRE III. — Hypothèse sur la structure des micelles lipo-protéïdiques.	143
CHAPITRE IV. — Problème de la réversibilité	145
CHAPITRE V. — Résumé et rappel des conclusions	147

CINQUIÈME PARTIE

CONCLUSIONS

CHAPITRE PREMIER. — Conclusions d'ordre pratique	150
CHAPITRE II. — Conclusions d'ordre général	155

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

- 1° Les acides aminés découverts par l'hydrolyse des matières protéiques depuis Emile Fischer.
- 2° Absorption et utilisation des substances organiques azotées par les végétaux supérieurs.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 11 octobre 1933.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

